

UNTERSUCHUNG DER SPANNUNGSINDUZIERTEN AKTIVIERUNG
HETEROMERER HCN2/HCN4-SCHRITTMACHERKANÄLE UND
DEREN LIGANDENABHÄNGIGKEIT

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

**vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena**

von Jana Rose

geboren am 29.06.1985 in Saalfeld/Saale

Gutachter

1. Prof. Dr. Klaus Benndorf, Jena
2. Prof. Dr. Christoph Biskup, Jena
3. Prof. Dr. Nikolaj Klöcker, Düsseldorf

Tag der öffentlichen Verteidigung: 06.02.2018

Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
cAMP	zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphat
cGMP	zyklisches 3',5'-Guanosinmonophosphat
CHO	<i>Chinese Hamster Ovary</i>
CNBD	<i>Cyclic Nucleotide-Binding Domain</i>
CNG	<i>Cyclic Nucleotide-Gated</i>
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
cRNA	komplementäre Ribonukleinsäure (<i>in vitro</i> Transkriptionsprodukt)
e	Eulersche Zahl
EC_{50}	Konzentration des halbmaximalen Effektes
EGTA	Ethylenglykol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
F	Faraday-Konstante
g	Gramm
H	Hill-Koeffizient
HA	Hämagglutinin
HCN	<i>Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Modulated</i>
HEK	<i>Human Embryonic Kidney</i>
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure
I	Strom
I_h	hyperpolarisationsaktivierter Strom
I_{max}	maximaler Strom bei sättigender Spannung
l	Liter
M	Molar
mHCN2	HCN2 der Maus
mHCN4	HCN4 der Maus
hHCN3	HCN3 des Menschen
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
P	Permeabilität
PIP ₂	Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat
PTFE	Polytetrafluorethylen
R	allgemeine Gaskonstante
s	Sekunde
T	absolute Temperatur
τ	Aktivierungszeitkonstante
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
V	Volt
V	Spannung
$V_{0,5}$	halbmaximale Aktivierungsspannung
$z\delta$	effektive <i>Gating</i> -Ladung

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	4
Inhaltsverzeichnis.....	5
Zusammenfassung	6
1 Einleitung	9
1.1 Frühe Experimente	9
1.2 Struktur.....	10
1.3 Schaltverhalten.....	12
1.4 Expressionsmuster	14
1.5 Heteromerisierung.....	15
1.6 Physiologische Bedeutung	17
1.7 Pathophysiologische Bedeutung	19
2 Ziele der Arbeit.....	23
3 Methodik	25
3.1 RNA-Herstellung	25
3.2 Lösungen und Chemikalien	26
3.3 Pipettenherstellung.....	26
3.4 Oozytenpräparation.....	27
3.5 Patch-Clamp-Messplatz	27
3.6 Patch-Clamp-Experimente	28
3.6.1 Messprotokoll.....	30
3.7 Datenanalyse	31
3.7.1 Bestimmung der Aktivierung im Gleichgewicht	31
3.7.2 Bestimmung der Aktivierungskinetik	33
3.7.3 Statistik.....	33
4 Ergebnisse	35
4.1 Aktivierung im Gleichgewicht.....	35
4.2 Aktivierungskinetik.....	49
5 Diskussion	53
5.1 Expression heteromerer HCN24-Kanäle	53
5.2 Spannungsinduziertes Schaltverhalten und dessen cAMP-Abhängigkeit	57
5.3 Modulation der scheinbaren Affinität durch die Spannung	61
5.4 Aktivierungskinetik.....	62
5.5 Ausblick	64
6 Schlussfolgerungen	67
7 Literaturverzeichnis.....	69
8 Anhang	79
8.1 Zusatzmaterial	79
8.2 Ehrenwörtliche Erklärung	83
8.3 Danksagung.....	84

Zusammenfassung

HCN (*H*yperpolarisation-*A*ctivated and *C*yclic *N*ucleotide-*M*odulated)-Kanäle sind nicht-selektive Kationenkanäle, die vor allem für ihre Schrittmacherfunktion im Herzen und im Gehirn bekannt sind. Sie leiten unter physiologischen Bedingungen Na^+ -Ionen in die Zelle hinein und sorgen somit für eine Depolarisation der Zellmembran und für die Einleitung eines neuen Aktionspotentials. Im Gegensatz zu anderen spannungsabhängigen Ionenkanälen werden sie nicht durch depolarisierende, sondern hyperpolarisierende Spannungen aktiviert. Aufgrund dieser besonderen biophysikalischen Eigenschaften wurde der HCN-Strom I_h im Herzen auch I_f (für *funny*) genannt. Durch ihre Funktion für die Kontrolle der Aktivität von Neuronen und Kardiomyozyten sind HCN-Kanäle auch an vielen pathophysiologischen Prozessen beteiligt. Dies kann zum Beispiel zu Epilepsie, neuropathischem Schmerz und Herzinsuffizienz führen.

In Säugetieren existieren vier Isoformen, HCN1 bis HCN4. HCN-Kanäle, die aus vier gleichen Untereinheiten zusammengesetzt sind (sogenannte homomere HCN-Kanäle), wurden bisher vielfach elektrophysiologisch charakterisiert und ihre Ströme mit nativen I_h verglichen. Die dabei entdeckte Diskrepanz und die überlappende Expression der vier HCN-Isoformen in verschiedenen Geweben legen nahe, dass native HCN-Kanäle aus unterschiedlichen Untereinheiten zusammengesetzt sind (sogenannte heteromere HCN-Kanäle).

In der vorliegenden Arbeit steht ein Vergleich des heteromeren HCN24-Kanals, bestehend aus HCN2- und HCN4-Untereinheiten, mit den entsprechenden homomeren Kanälen im Vordergrund und dabei insbesondere die Frage, in welchem Ausmaß eine Variation der Kanalzusammensetzung zu Unterschieden im Schaltverhalten führen kann.

Dazu wurden die Isoformen HCN2 und HCN4 der Maus nach RNA-Injektion in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert und mit Hilfe der *Patch-Clamp*-Technik untersucht. Dabei zeigte sich, dass die Koexpression von mHCN2- und mHCN4-Untereinheiten in Oozyten von *Xenopus laevis* zum Einbau funktioneller heteromerer HCN24-Kanäle in die Oozytenmembran führt und dass heteromere HCN24-Kanäle von homomeren HCN2- und HCN4-Kanälen verschiedene elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen. Die spannungsinduzierte Aktivierung heteromerer HCN24-Kanäle verläuft schneller als die des homomeren HCN4-Kanals und genauso schnell wie die des homomeren HCN2-Kanals.

Die Aktivierungsgeschwindigkeit der heteromeren Kanäle wurde durch die schneller aktivierende Untereinheit bestimmt. Heteromere HCN24-Kanäle öffneten in der *Cell-attached*-Konfiguration unter dem Einfluss des Oozytenzytosols und im exzidierten *Patch* ohne jegliche Ligandenmodulation bei positiveren Spannungen als die homomeren HCN2- und HCN4-Kanäle. Zusätzlich wurden die heteromeren HCN24-Kanäle im Vergleich zu den homomeren Kanälen weniger stark durch cAMP moduliert, was sich durch eine verminderte Verschiebung ihrer Aktivierungskurven durch cAMP beobachten ließ. Diese beiden Unterschiede sind vermutlich auf eine weniger stark ausgeprägte Autoinhibition der heteromeren Kanäle zurückzuführen. Dabei handelt es sich um einen inhibierenden Effekt der unligandierten C-terminalen Region auf die spannungsabhängige Kanalaktivierung. Weiterhin ergab ein Vergleich verschiedener *Patch-Clamp*-Konfigurationen, dass für die homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 unter Einfluss einer sättigenden cAMP-Konzentration in der *Inside-out*-Konfiguration die gleichen $V_{0,5}$ -Werte erreicht werden konnten wie in der *Cell-attached*-Konfiguration. Für die heteromeren HCN24-Kanäle war dies aber nicht möglich. Dieser Unterschied ist wahrscheinlich auf eine stärkere Modulation heteromerer HCN24-Kanäle durch intrazelluläre Faktoren zurückzuführen.

Die in der vorliegenden Arbeit erhobenen Daten zeigen, dass heteromere HCN24-Kanäle elektrophysiologische Eigenschaften aufweisen, die sich nicht durch die Kombination der Eigenschaften homomerer HCN2- und HCN4-Kanäle erklären lassen. Dies lässt vermuten, dass die Bildung heteromerer HCN-Kanäle eine Möglichkeit darstellt, das Schaltverhalten der HCN-Kanäle *in vivo* an gewebespezifische Anforderungen anzupassen.

1 Einleitung

Jede Zelle wird durch eine Membran von ihrer Umgebung abgetrennt. Für den Stoffaustausch zwischen intrazellulärem und extrazellulärem Raum werden Membranproteine benötigt. Eine Klasse der Membranproteine, die Ionenkanäle, ermöglichen geladenen Teilchen die Lipiddoppelschicht der Membran zu passieren.

Anhand der permeierenden Ionen werden Kationen- und Anionenkanäle unterschieden. Die Kationenkanäle lassen sich in hochselektive Na^+ -, K^+ - und Ca^{2+} - sowie nicht-selektive Kationenkanäle unterteilen. Außerdem ist eine Ionenkanal-Klassifizierung anhand des Stimulus, der den Aktivierungszustand moduliert, üblich. Zu diesen Stimuli zählen Membranspannung, Ligandenbindung, Temperatur, mechanische Kräfte und Osmolarität.

Ligandengesteuerte Ionenkanäle ändern ihren Aktivierungszustand durch Bindung von Transmittern oder intrazellulären Botenstoffen. Spannungsgesteuerte Ionenkanäle werden durch depolarisierende oder hyperpolarisierende Änderungen der Membranspannung aktiviert. Als Depolarisation wird die Änderung des Membranpotentials in Richtung positiverer Werte, als Hyperpolarisation die Änderung in Richtung negativerer Werte bezeichnet.

Das Fehlen von Ionenkanälen oder die Expression fehlerhaft arbeitender Ionenkanäle beeinträchtigt nicht nur die Funktion einer einzelnen Zelle, sondern kann zur Erkrankung des gesamten Organismus' führen. Im Fall der HCN-Kanäle können zum Beispiel Epilepsie, neuropathischer Schmerz oder Herzrhythmusstörungen auftreten.

1.1 Frühe Experimente

Im Rahmen der Untersuchung elektrischer Eigenschaften von Zellen des Sinusknotens im Herzen (Noma und Irisawa, 1976; Brown et al., 1977) und von Stäbchenzellen der Netzhaut (Fain et al., 1978) wurde in den späten 1970er Jahren ein hyperpolarisationsaktivierter Strom (I_h) beschrieben. Dies war bemerkenswert, da die bisher bekannten spannungsinduzierten Ströme durch Depolarisation hervorgerufen wurden. Wenig später wurde ein hyperpolarisationsaktivierter Strom auch in Neuronen (Halliwell und Adams, 1982) nachgewiesen. Aufgrund seiner besonderen biophysikalischen Eigenschaften wurde dieser

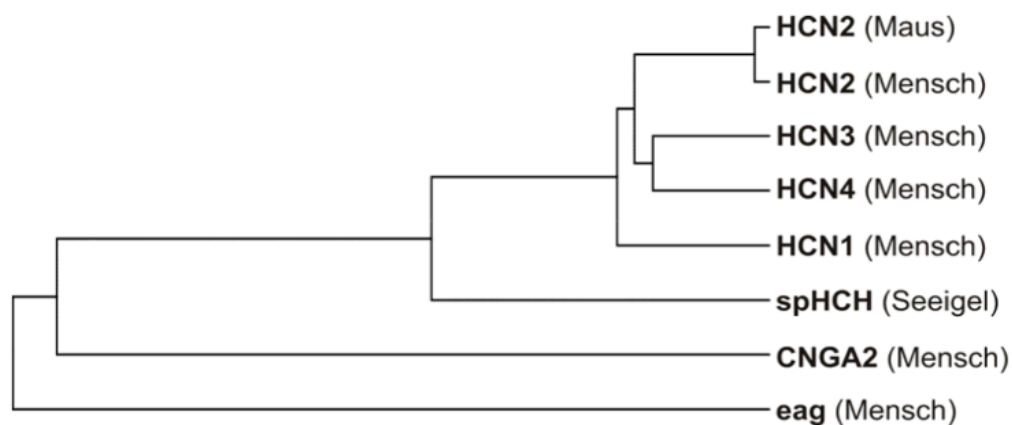
Strom im Herzen auch I_f für *funny* (Brown et al., 1979) oder im Gehirn I_q für *queer* (Halliwell und Adams, 1982) genannt. In der vorliegenden Arbeit werden alle Ströme durch HCN-Kanäle, unabhängig von ihrer Lokalisation in Organen, mit I_h bezeichnet. Neben der Spannungsabhängigkeit konnte eine Modulation dieses Stromes durch cAMP nachgewiesen werden (DiFrancesco und Tortora, 1991).

Später bezeichnete man die zu Grunde liegenden Kanäle aufgrund ihres dualen Schaltverhaltens als HCN-Kanäle, für *Hyperpolarization-Activated and Cyclic Nucleotide-Modulated*. Die ersten Klonierungen erfolgten in den 1990er Jahren. In Säugern konnten vier HCN-Isoformen identifiziert werden: HCN1 bis HCN4. Zunächst wurde HCN1 (Santoro et al., 1997) kloniert, kurz darauf HCN2, HCN3 und HCN4 (Santoro et al., 1998; Ludwig et al., 1998; Ishii et al., 1999). Der Nachweis aller Isoformen im menschlichen Genom konnte mit hHCN3 (HCN3 des Menschen, *human* = h) als Nachzügler erst 2005 vervollständigt werden (Ludwig et al., 1999; Stieber et al., 2005). HCN-Kanäle wurden ebenso bei wirbellosen Tieren entdeckt, zum Beispiel spHCN in den Spermien des Seeigels *Strongylocentrotus purpuratus* (Gauss et al., 1998). Durch die Aufklärung der molekularen Grundlagen des I_h wurde die heterologe Expression und damit eine genaue Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften möglich.

1.2 Struktur

HCN-Kanäle gehören zusammen mit den CNG (*Cyclic Nucleotide-Gated*)-Kanälen zur Untergruppe der Zyklonukleotid-modulierten Kationenkanäle, die wiederum der Familie der Porenschleifen-Kationenkanäle angehören. Aufgrund von Struktur und Funktion können sie auch der Untergruppe der spannungsaktivierten K^+ -Kanäle zugeordnet werden (Biel et al., 2009) (Bild 1.1).

HCN-Kanäle sind wie alle spannungsaktivierten K^+ -Kanäle aus vier Untereinheiten zusammengesetzt, die eine zentrale Pore bilden. Jede Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Segmenten S1 bis S6 (Yellen, 2002). Die N-terminale und die C-terminale Region liegen intrazellulär. In der C-terminalen Region befindet sich die Bindungsstelle für zyklische Nukleotide (CNBD, *Cyclic Nucleotide-Binding Domain*), die durch den C-linker mit dem S6 verbunden ist (Bild 1.2). Jede CNBD kann einen Liganden binden, sodass jeder HCN-Kanal durch die Bindung von maximal vier Liganden moduliert werden kann.



Im Stammbaum sind die Verwandtschaft der HCN-Isoformen und ihre Verwandtschaft zu anderen Kationenkanälen, am Beispiel der CNG-Kanäle (CNGA2-Untereinheit) und der eag (ether-a-go-go)-K⁺-Kanäle dargestellt. Der Stammbaum wurde anhand der Sequenzhomologien der Aminosäuresequenzen erstellt. Modifiziert nach Thon, 2012

Die Aminosäuresequenzen der transmembranären Region und der CNBD sind zwischen den HCN-Isoformen HCN1 bis HCN4 stark konserviert. Die Sequenzhomologie beträgt 80 - 90 %. Dabei weist die Porenregion die geringsten Abweichungen auf. Die zytosolische N-terminale Region und die Aminosäuresequenz distal der CNBD unterscheiden sich in Länge und Anordnung der Aminosäuren. Die Sequenzhomologie dieser Kanalabschnitte ist zwischen den vier Isoformen gering (Kaupp und Seifert, 2001).

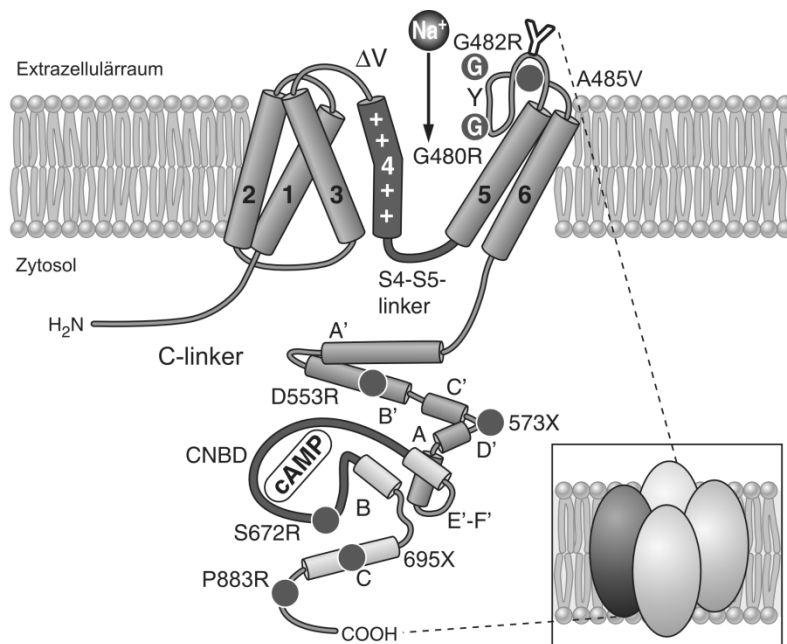


Bild 1.2: Schematische Darstellung der Struktur einer HCN-Untereinheit

Eine Untereinheit besteht aus sechs transmembranären Segmenten (S1-S6), von denen S4 als Spannungssensor dient. S5 und S6 aller vier Untereinheiten bilden gemeinsam die ionenleitende Pore mit dem GYG-Selektivitätsfilter. N-terminale und C-terminale Region liegen intrazellulär. Die C-terminale Region besteht aus C-Linker (α -Helices A'-F') und CNBD. Diese besteht aus drei α -Helices (A-C) und β -Faltblättern (dicke graue Linie) zwischen den α -Helices A und B. Bekannte Mutationen des menschlichen HCN4-Gens sind mit grauen Punkten markiert und beschriftet. Im kleinen Bild ist die Anordnung der Untereinheiten zu einem Kanaltetramer dargestellt. Modifiziert nach Biel et al., 2009

1.3 Schaltverhalten

HCN-Kanäle werden im Gegensatz zur Mehrheit der spannungsaktivierten Kanäle durch eine Hyperpolarisation der Zellmembran aktiviert. Zusätzlich werden sie durch zyklische Nukleotide moduliert. Unter Einfluss von cAMP oder cGMP verhalten sich HCN-Kanäle als ob sie durch eine stärkere Hyperpolarisation aktiviert würden. Damit weisen sie ein duales Schaltverhalten (*Gating*) auf.

Der primäre Stimulus zur Kanalaktivierung ist die hyperpolarisierende Spannung. Diese verursacht wahrscheinlich eine Einwärtsbewegung des Spannungssensors S4, welche die Öffnung der Kanalpore auslöst. Die spannungsinduzierte Aktivierung der HCN-Kanäle kann in einer Gleichgewichts-Aktivierungskurve dargestellt werden. Sie ist sigmoid und kann durch eine Boltzmann-Funktion (Gleichung 3.1) beschrieben werden (Edman et al., 1987). Die HCN-Kanäle aktivieren relativ langsam. Ihre makroskopischen Stromamplituden erreichen erst nach mehreren hundert Millisekunden bis mehreren Sekunden ihr Maxi-

mum. Mit zunehmender hyperpolarisierender Spannung wird die Aktivierung beschleunigt. Die HCN-Kanäle der Säugetiere zeigen keine Inaktivierung bei anhaltend hyperpolarisierender Spannung.

Liegt eine hyperpolarisierende Spannung an, kann die Kanalaktivierung durch die Bindung zyklischer Nukleotide an die intrazellulären Bindungsstellen gesteigert werden. Die Ligandenbindung ist somit der sekundäre Stimulus. Sowohl cAMP als auch cGMP können an die CNBD binden und einen ähnlich starken Effekt auf die Kanäle ausüben. cGMP muss dafür aber in einer vielfach höheren Konzentration vorliegen als cAMP (Ludwig et al., 1998). Damit ist die cAMP-Bindung physiologisch relevanter. Durch Bindung eines zyklischen Nukleotids wird die Aktivierungskurve des HCN-Kanals in Richtung positiverer Spannungen verschoben, d. h. der Kanal öffnet bereits bei schwächerer Hyperpolarisation (DiFrancesco, 1993). In der Konsequenz entwickelt sich der Strom durch den Kanal bei gleicher Membranspannung in Anwesenheit eines Liganden schneller und erreicht eine höhere Amplitude.

Die unligandierte CNBD und der C-Linker üben gemeinsam eine basale Hemmung auf die Transmembranregion aus, eine sogenannte Autoinhibition, die durch Bindung zyklischer Nukleotide aufgehoben wird (Wainger et al., 2001; Wang et al., 2001). Die allosterischen Grundlagen dieser Autoinhibition und ihrer Aufhebung durch Ligandenbindung sind noch weitestgehend ungeklärt. Es wird vermutet, dass der C-Linker durch die Besetzung der CNBD mit einem zyklischen Nukleotid seine Konformation ändert und somit keine Hemmung mehr auf die Kanalöffnung ausüben kann. Ob der C-Linker nach Ligandenbindung eine lockere Konformation einnimmt (Zagotta et al., 2003) oder in einer kompakten Form vorliegt (Akimoto et al., 2014), ist noch nicht geklärt.

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der vier HCN-Isoformen unterscheiden sich bezüglich ihrer Spannungsabhängigkeit, ihrer Aktivierungsgeschwindigkeit und dem Ausmaß der Modulation durch zyklische Nukleotide. Kanäle aus HCN1-Untereinheiten aktivieren am schnellsten, gefolgt von den Kanälen HCN2, HCN3 und HCN4. Im Gegensatz zu den nur schwach cAMP-abhängigen HCN1- und HCN3-Kanälen weisen HCN2- und HCN4-Kanäle eine starke Modulierbarkeit durch cAMP auf (zusammengefasst in Biel et al., 2009). Die Spannungsabhängigkeit und damit die Bestimmung der halbmaximalen Spannung $V_{0,5}$ hängen vom Expressionssystem (Qu et al., 2002; St Clair et al., 2013) und von der Messkonfiguration ab, weshalb die Isoformen in diesem Punkt nur bedingt miteinander verglichen werden können.

1.4 Expressionsmuster

HCN-Kanäle werden in Säugetieren in verschiedenen Organen exprimiert. Die stärkste Expression zeigen HCN-Kanäle im Herzen und im zentralen Nervensystem. Eine geringe Expression wurde aber auch in vielen anderen Geweben, wie zum Beispiel im enterischen Nervensystem, den Hoden, der glatten Muskulatur in Gefäßwänden und den β -Zellen des Pankreas, festgestellt. Die Expressionsmuster der HCN-Isoformen unterscheiden sich allerdings stark zwischen den Spezies. Bei der Untersuchung der Expressionsmuster wird nur das Vorkommen der verschiedenen HCN-Untereinheiten in den untersuchten Geweben und ihr Mengenverhältnis zueinander erfasst, nicht aber die Zusammensetzung der Kanäle.

Im zentralen Nervensystem ist HCN1 die am stärksten exprimierte Isoform. Sie wird im Neokortex, Hippocampus, der Kleinhirnrinde, im Stammhirn sowie im Rückenmark exprimiert. HCN2-Untereinheiten sind ubiquitär in allen Teilen des Gehirns zu finden. Am stärksten werden sie im Thalamus und in den Stammhirn-Kernen exprimiert. Die Isoform HCN3 wird im zentralen Nervensystem nur sehr schwach exprimiert. Etwas häufiger ist sie im Riechkolben und in bestimmten hypothalamischen Kernen zu finden. HCN4-Untereinheiten werden punktuell in verschiedenen thalamischen Kernen und dem Stratum mitrale des Riechkolbens exprimiert. Im peripheren Nervensystem werden HCN-Kanäle in den Spinalganglien exprimiert. Dort finden sich alle HCN-Isoformen, wobei von ihnen HCN1 am stärksten exprimiert wird (zusammengefasst in Biel et al., 2009).

Im Herzen sind HCN-Kanäle in fast allen Zelltypen zu finden. Dabei sind die Expressionsniveaus im Erregungsbildungs- und Reizleitungssystem generell um ein Mehrfaches höher als im Myokard (Herrmann et al., 2011b). Im Sinusknoten ist HCN4 die dominierende Isoform. Murine Kardiomyozyten von Embryonen, die keine HCN4-Untereinheiten exprimieren, haben im Vergleich zu den Wildtyp-Kardiomyozyten einen um 85% reduzierten I_h (Stieber et al., 2003a). 80 % der HCN-mRNA des Sinusknoten sind HCN4-RNA, während die Untereinheiten HCN1, HCN2 und HCN3 nur schwach exprimiert werden und ihre Expression zusätzlich stark von der untersuchten Spezies abhängt (Shi et al., 1999; Moosmang et al., 2001; Thollon et al., 2007). Immunfluoreszenzuntersuchungen haben gezeigt, dass auch an menschlichen Sinusknotenzellen die Isoform HCN4 mit 80 % der gesamten HCN-Expression am stärksten exprimiert wird, während die restlichen 20 % vor allem von HCN1-Untereinheiten eingenommen werden (Chandler et al., 2009). Auch im Reizleitungssystem des Herzens (AV-Knoten und Purkinje-Fasern) wird die Isoform HCN4 am

stärksten exprimiert (Dobrzynski et al., 2003; Shi et al., 1999). Im Arbeitsmyokard und den Vorhofzellen wird die HCN2-Untereinheit am stärksten exprimiert. Sie zeigt die gleichmäßigsten Expressionsniveaus in allen Zellarten des Herzens (Biel et al., 2009). Über die Expressionsmuster im adulten Organismus hinaus ist bekannt, dass sich das Verhältnis der Isoformen mit dem Herzwachstum nach der Geburt verändert (Shi et al., 1999).

1.5 Heteromerisierung

Nachdem die verschiedenen HCN-Isoformen kloniert und in heterologen Expressionssystemen untersucht wurden, verglich man die resultierenden Ströme mit den in nativen Zellen gemessenen Strömen (I_h). Dabei zeigte sich, dass nicht alle Eigenschaften des nativen I_h durch die Expression homomerer HCN-Kanäle zu erklären sind. Für die Abweichungen sind zwei Hauptgründe denkbar. Zum einen könnten verschiedene homomere HCN-Kanäle in einer Zelle koexistieren, wofür überlappende Expressionsmuster verschiedener HCN-Isoformen sprechen (Moosmang et al., 2001). Zum anderen wäre die Ko-Assemblierung verschiedener HCN-Untereinheiten zu heteromeren Kanälen eine mögliche Erklärung (Ludwig et al., 1999; Ulens und Tytgat, 2001; Chen et al., 2001b).

Die Frage der Ko-Assemblierung wurde mit den nachfolgenden Methoden untersucht. Nach Koexpression verschiedener HCN-Isoformen konnte anhand der elektrophysiologischen Eigenschaften gezeigt werden, dass sich funktionsfähige heteromere HCN-Kanäle bilden. Das Aktivierungsverhalten zeigte jeweils Eigenschaften, die durch eine pure Kombination der entsprechenden homomeren HCN-Kanäle nicht erklärt werden können. Ulens und Tytgat (2001) haben HCN1-HCN2-Konkatamere in *Xenopus laevis* Oozyten exprimiert sowie HCN1- und HCN2-Untereinheiten koexprimiert. Die Eigenschaften des Stromes der Konkatamere und des Stromes der koexprimierten Kanäle sind sich sehr ähnlich. Die Konkatamere und koexprimierten Kanäle aktivierten schneller als es aus den Mittelwerten der Aktivierungsgeschwindigkeiten von homomeren HCN1- und HCN2-Kanälen zu erwarten war (Ulens und Tytgat, 2001). Chen und Mitarbeiter (2001b) beobachteten nach Koexpression von HCN1- und HCN2-Untereinheiten in *Xenopus laevis* Oozyten Parameter wie die Aktivierungskinetik, spannungsinduzierte Aktivierung und Modulation durch cAMP, die nicht durch die Kombination von Eigenschaften der homomeren Kanäle HCN1 und HCN2 erklärt werden können (Chen et al., 2001b).

Ein weiterer Ansatz des Nachweises einer Heteromerisierung ist die Koexpression von mutierten und nicht-mutierten HCN-Untereinheiten. Xu und Mitarbeiter (2002) mutierten den Selektivitätsfilter (GYG) des HCN1-Kanals. Nach Expression dieses mutierten Kanals in *Xenopus laevis* Oozyten konnte kein Strom gemessen werden. Nach Koexpression mit funktionstüchtigen HCN1- oder HCN2-Untereinheiten konnten Ströme gemessen werden, allerdings mit stark reduzierten Stromamplituden im Vergleich zur alleinigen Expression der Wildtypen. Interessanterweise reduzierten die mutierten HCN1-Untereinheiten den Strom beider Wildtyp-Kanäle in gleichem Umfang (Xue et al., 2002), was für eine Heteromerisierung von HCN1- mit HCN2-Untereinheiten spricht. Proenza und Mitarbeiter (2002) haben eine HCN2-Mutante ohne CNBD in CHO-Zellen (*Chinese Hamster Ovary*) exprimiert. Der Einbau dieser Kanalvariante in die Plasmamembran wurde behindert, was zum Ausbleiben des Stromsignals führte. Durch Koexpression mit Wildtyp HCN1-Untereinheiten konnte der Einbau in die Plasmamembran wiederhergestellt und ein Stromsignal gemessen werden (Proenza et al., 2002). Weiterhin wurde ein HCN2-Kanal mit mutiertem Selektivitätsfilter in CHO-Zellen exprimiert. Diese mutierte Untereinheit konnte, wie die HCN1-Mutante von Xu, bei alleiniger Expression keine funktionsfähigen Kanäle bilden und hat bei Koexpression mit Wildtyp HCN2-Untereinheiten die Bildung funktionsfähiger Kanäle unterdrückt. Auch die Koexpression mit Wildtyp HCN4-Untereinheiten verringerte die Stromdichte im Vergleich zur Expression der Wildtyp HCN4-Untereinheiten allein (Er et al., 2003), was eine Heteromerisierung von HCN2- und HCN4-Untereinheiten nahe legt.

Nachdem funktionelle Experimente zeigten, dass die Heteromerisierung von HCN-Untereinheiten sehr wahrscheinlich ist, haben Much und Mitarbeiter (2003) mit einer Kombination aus konfokaler Fluoreszenz-Mikroskopie, Ko-Immunpräzipitation und Elektrophysiologie systematisch die Ko-Assemblierung aller HCN-Isoformen untersucht. Es zeigte sich, dass alle HCN-Isoformen in HEK-Zellen (*Human Embryonic Kidney*) funktionsfähige heteromere Kanäle bilden. Eine Ausnahme stellt die Kombination von HCN2- mit HCN3-Untereinheiten dar (Much et al., 2003). Die Stöchiometrie der Heteromere wurde mit optischen und funktionellen Messungen untersucht. Dabei zeigte sich, dass sich HCN2- und HCN4-Untereinheiten mit gleicher Präferenz mit sich selbst und der jeweils anderen Isoform zu einem Kanaltetramer zusammenlagern (Whitaker et al., 2007).

Der Nachweis von heteromeren HCN-Kanälen *in vivo* gelang mit Hilfe der Ko-Immunpräzipitation. Heteromere HCN12-Kanäle wurden in Gehirnzellen nachgewiesen

(Much et al., 2003). Im Herzen von Mausembryonen sowie im Thalamus (Whitaker et al., 2007) und Myokard von Ratten (Zhang et al., 2009) wurden heteromere HCN24-Kanäle gefunden.

Bei Vergleichen der Ströme konkatenierter HCN1-HCN4-Kanäle (Altomare et al., 2003) bzw. konkatenierter HCN1-HCN2-Kanäle (Ulens und Tytgat, 2001) mit den entsprechenden Schrittmacherströmen fiel auf, dass die Ströme der heteromeren Kanäle den nativen I_h ähnlicher sind als die Ströme der homomeren HCN-Kanäle. Eine genaue Übereinstimmung konnte allerdings nicht festgestellt werden. Die geringfügigen Unterschiede sind vermutlich durch die Umgebungsabhängigkeit der HCN-Kanäle zu erklären. Diese äußert sich zum Beispiel in unterschiedlicher spannungsinduzierter Aktivierung eines HCN-Kanals in Abhängigkeit vom heterologen Expressionssystem.

Die Heteromerisierung spielt vermutlich nicht nur für physiologische Prozesse eine Rolle, sondern ist auch an pathologischen Prozessen beteiligt. Brewster und Mitarbeiter untersuchten den Zusammenhang zwischen epileptischen Anfällen und Heteromerisierung von HCN1- und HCN2-Untereinheiten im Hippocampus. Dabei konnte mit Ko-Immunpräzipitation von Hirngewebe vor und nach epileptischen Anfällen festgestellt werden, dass die pathologische Aktivität der Neurone die Heteromerisierung steigert (Brewster et al., 2005).

1.6 Physiologische Bedeutung

Im Herzen ist die am längsten bekannte Funktion des I_h die Beteiligung an der Ausbildung des Aktionspotentials der Sinusknotenzellen als Schrittmacherstrom (DiFrancesco, 1991). Die Funktion von I_h ist es, die nach einem Aktionspotential hyperpolarisierte Zellmembran bis zur Aktivierungsschwelle spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle zu depolarisieren. Diese tragen die schnelle Depolarisation eines neuen Aktionspotentials (Bild 1.3). Darüber hinaus wird die Herzfrequenz hauptsächlich über I_h gesteuert. Signale des sympathischen und parasympathischen Nervensystems führen zu einer Veränderung der cAMP-Konzentration in Sinusknotenzellen und damit zur Modulation der HCN-Kanäle (DiFrancesco und Tortora, 1991). Der Aktivierungszustand der HCN-Kanäle bestimmt, wie schnell das Membranpotential die Schwelle für ein neues Aktionspotential erreicht, wodurch die Herzfrequenz determiniert wird.

Weniger bekannt ist die Funktion des I_h in ventrikulären Myozyten. Dort stellt I_h einen Gegenspieler zu K^+ -Strömen in der späten Repolarisationsphase des Arbeitsmyokards dar und verlängert so das Aktionspotential. HCN3-*Knockout*-Mäuse zeigten ein verkürztes Aktionspotential epikardialer Myozyten, nicht aber endokardialer Myozyten (Fenske et al., 2011).

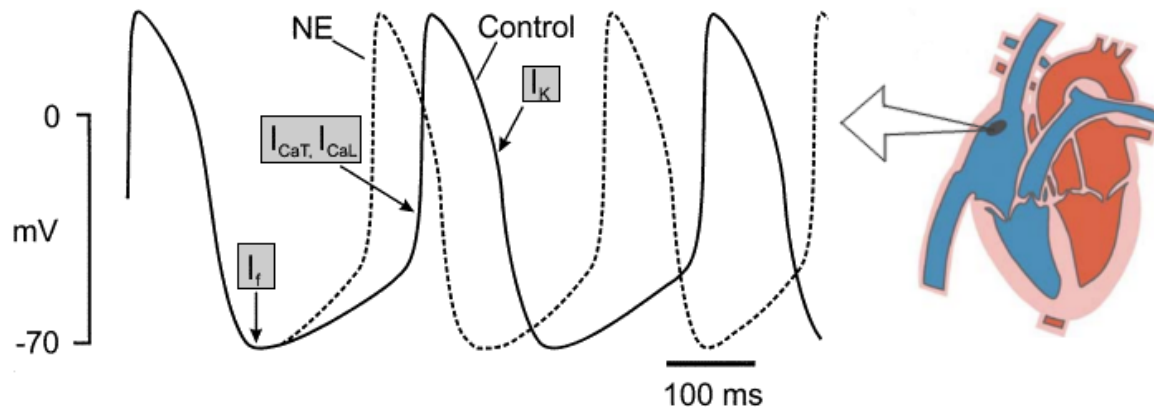


Bild 1.3: Schrittmacherfunktion I_h im Sinusknoten

Links: Dargestellt ist das Aktionspotential eines Myozyten aus dem Sinusknoten im Ruhezustand (Control) und nach Zugabe von Noradrenalin (Norepinephrine = NE). Das Aktionspotential des Sinusknotens wird hauptsächlich durch folgende Ströme getragen: die langsame diastolische Depolarisation durch I_f ($= I_h$), die schnelle Depolarisation durch T-Typ (I_{CaT}) und L-Typ (I_{CaL}) Ca^{2+} -Kanäle, die Repolarisation durch K^+ -Kanäle (I_K). *Rechts:* Dargestellt ist die Lage des Sinusknotens (schwarzer Bereich) im Herzen. Modifiziert nach Biel et al., 2002 und Craven und Zagotta, 2006

Im Gehirn übt der durch HCN-Kanäle getragene I_h ebenso eine Schrittmacherfunktion aus. Er moduliert rhythmische Oszillationen von Einzelneuronen und neuronalen Netzwerken. Im Thalamus, einer wichtigen Schaltstelle für sensorische Informationen auf dem Weg zum Neokortex, ermöglichen HCN-Kanäle wie im Herzen die Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen. Dadurch stellt sich eine Oszillation des Membranpotentials der Thalamusneurone ein, die Abfolgen von Aktionspotentialen auslösen (Bild 1.4). Die Frequenz dieser Aktionspotential-Abfolgen beeinflusst den Schlaf-Wach-Rhythmus (McCormick und Pape, 1990). Neben der Schrittmacherfunktion haben die HCN-Kanäle eine wichtige Funktion für die Informationsverarbeitung. I_h beeinflusst die Informationsverarbeitung von Neuronen, indem er die Fortleitung von exzitatorischen postsynaptischen Potentialen, die an Dendriten weit vom Zellkörper entfernt entstehen, beschleunigt. So werden Signale in diesen Neuronen unabhängig von der Entfernung, in der sie vom Zellkörper auf das Neuron übertragen werden, verarbeitet (Magee, 2000). Zusammen mit K^+ -Kanälen stellen die HCN-Kanäle in vielen Neuronen das Ruhemembranpotential ein und beeinflussen so deren Erregbarkeit (Pape, 1996).

Weiterhin ist I_h an der Synchronisation neuronaler Aktivität in komplexen neuronalen Netzwerken, synaptischer Plastizität und Gedächtnisbildung beteiligt (Beaumont und Zucker, 2000; Huang und Hsu, 2003). Im peripheren Nervensystem spielen HCN-Kanäle für die Schmerzwahrnehmung eine wichtige Rolle (Ingram und Williams, 1996; Luo et al., 2007).

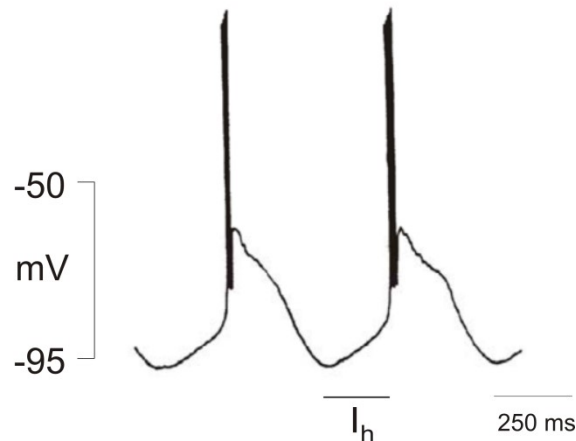


Bild 1.4: Schrittmacherfunktion I_h in Thalamusneuronen

Dargestellt ist das Aktionspotential eines Thalamusneurons. Die Aktivierung des durch HCN-Kanäle getragenen I_h verursacht eine langsame Membrandepolarisation, die zur Aktivierung von Ca^{2+} -Kanälen führt. Die durch Ca^{2+} -Kanäle getragene Membrandepolarisation löst Aktionspotentiale aus. Modifiziert nach Pape, 1996

1.7 Pathophysiologische Bedeutung

HCN-Kanäle können sowohl an neuronalen als auch an kardialen pathophysiologischen Prozessen beteiligt sein. So ist eine veränderte Funktion der HCN-Kanäle in bestimmten Neuronen mit Epilepsie assoziiert. Es wurden sowohl eine verstärkte als auch eine verminderte Expression von HCN-Kanälen bei Epilepsie beobachtet. Es ist noch unklar, ob die veränderte Expression der HCN-Kanäle eine Übererregbarkeit verursacht oder einen Kompensationsmechanismus in den übererregbaren Neuronen darstellt (Chen et al., 2001a; Bender et al., 2003; Brewster et al., 2005).

Weiterhin spielen HCN-Kanäle in der Pathophysiologie neuropathischer Schmerzen eine wichtige Rolle. Durch Schädigung nozizeptiver Neurone werden spontane ektopische Entladungen im Nerven oder im betroffenen Spinalganglion ausgelöst. Diese spontanen Entladungen werden durch veränderte Expressionsdichten verschiedener spannungsgesteuerter Na^+ - und HCN-Kanäle generiert und aufrecht erhalten (Jiang et al., 2008).

Bei Herzerkrankungen, wie Hypertrophie oder Herzinsuffizienz, finden pathologische Umbauprozesse im Arbeitsmyokard statt, die zur Abnahme der Herzleistung (Herzzeitvolumen) führen. Durch die Umbauprozesse wird die Expression der Ionenkanäle im Myokard verändert. Die erhöhte Expression von HCN2- und HCN4-Kanälen verursacht eine verstärkte Neigung zur ektopen Erregungsbildung. Als Folge treten am erkrankten Herzen vermehrt Herzrhythmusstörungen auf (Herrmann et al., 2011a) (Bild 1.5). Als eine Ursache für die erhöhte HCN-Expression im Rahmen der pathologischen Umbauprozesse am Herzen konnte Angiotensin II identifiziert werden (Cerbai et al., 2003). Auch am menschlichen Herzen konnte eine erhöhte HCN-Expression bei Herzinsuffizienz nachgewiesen werden (Borlak und Thum, 2003).

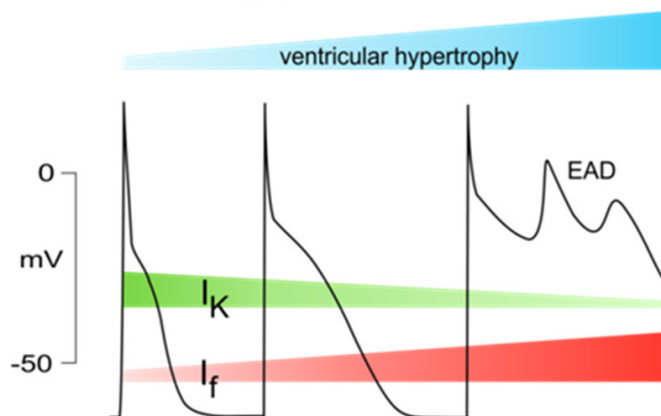


Bild 1.5: Veränderung der Kanalexpression im Arbeitsmyokard bei Herzhypertrophie

Dargestellt ist die pathologische Verlängerung des Aktionspotentials von Myozyten im Ventrikel bei fortschreitender Herzhypertrophie. Mit zunehmender Hypertrophie nimmt der Strom durch K^+ -Kanäle (I_K) ab und der Strom durch HCN-Kanäle (I_f) zu. Beides verlängert das Aktionspotential durch die Verzögerung der Repolarisation, was ein erhöhtes Risiko für frühe Nachdepolarisationen (*Early After Depolarization* = EAD) zur Folge hat. Modifiziert nach Herrmann et al., 2015

HCN-Kanäle sind nicht nur an der Pathophysiologie verschiedener Erkrankungen beteiligt. Sie können selbst der Auslöser von Erkrankungen sein. Bisher wurden acht Mutationen des HCN-Kanals entdeckt (siehe Bild 1.2). Die Mutationen betreffen alle das HCN4-Gen und wurden beim Menschen bisher nur im heterozygoten Genotyp gefunden (Schulze-Bahr et al., 2003; Ueda et al., 2004; Milanese et al., 2006; Nof et al., 2007; Laish-Farkash et al., 2010; Schweizer et al., 2010, 2014). Der Phänotyp aller Mutationen ist eine unterschiedlich stark ausgeprägte Bradykardie. Vermutlich wurden bisher keine Patienten mit homozygotem Genotyp gefunden, weil die Entwicklung eines lebensfähigen Organismus mit der Mutation beider HCN4-Allele nicht möglich ist.

Da der von HCN-Kanälen getragene Strom I_h eine wichtige Rolle bei der Entstehung von Aktionspotentialen im Sinusknoten des Herzens spielt und damit die Herzfrequenz beeinflusst, wurden verschiedene spezifische Blocker für diesen Kanal entwickelt. Dazu zählen ZD7288, das von Clonidin abgeleitete Alinidin (ST567) sowie die Gruppe der Bradine, die vom Ca^{2+} -Kanal-Blocker Verapamil abgeleitet wurden, einschließlich Zatebradin (UL-FS49), Cilobradin (DK-AH269) und Ivabradin (S16257). Von diesen Substanzen wurde Ivabradin 2005 als Arzneimittel zugelassen und wird seither zur Therapie von chronischer stabiler *Angina pectoris* eingesetzt.

2 Ziele der Arbeit

Um physiologische und pathologische Mechanismen zu verstehen sowie Angriffspunkte für pharmakologische Wirkstoffe zu finden, ist es von grundlegender Bedeutung, das Verhalten der HCN-Schrittmacherkanäle weiter zu charakterisieren, insbesondere das spannungsinduzierte Schaltverhalten dieser Kanäle und dessen Ligandenabhängigkeit.

Verschiedene Publikationen deuten darauf hin, dass sich HCN2- und HCN4-Untereinheiten in heterologen Zellsystemen sowohl zu homomeren Kanälen als auch zu heteromeren Kanälen zusammenlagern (Stieber et al., 2003b; Much et al., 2003; Zhang et al., 2009). In der vorliegenden Arbeit soll ein Baustein zur Beantwortung der Frage geliefert werden, in welcher Art und Weise die Heteromerisierung der HCN2- und HCN4-Untereinheiten das Schaltverhalten im Vergleich zu homomeren Kanälen verändert.

Mit Hilfe elektrophysiologischer Methoden sollen folgende Fragen in dieser Arbeit beantwortet werden:

- 1) Wie unterscheidet sich das spannungsinduzierte Schaltverhalten heteromerer HCN2/4-Kanäle von dem der beiden homomeren Kanalvarianten im Gleichgewicht? Welchen Einfluss hat dabei die cAMP-Konzentration auf die Gleichgewichtsparameter Schaltverhaltens halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0,5}$ und effektive *Gating*-Ladung $z\delta$?
- 2) Welchen Einfluss hat die Spannung auf die Gleichgewichtsparameter Ligandenkonzentration des halbmaximalen Effektes EC_{50} und Hill-Koeffizient H ?
- 3) Welchen Einfluss hat die Heteromerisierung auf die Kinetik der spannungsinduzierten Aktivierung? In welcher Weise wird diese Kinetik durch Ligandenbindung moduliert?

3 Methodik

Die elektrophysiologischen Eigenschaften der unterschiedlichen HCN-Kanäle wurden durch *Patch-Clamp*-Experimente an Oozyten des südafrikanischen Krallenfrosches *Xenopus laevis* bestimmt.

3.1 RNA-Herstellung

Zur heterologen Expression wurden Oozyten mit cRNA von HCN2 und HCN4 der Maus injiziert. Die cDNA für mHCN2 (HCN2 der Maus, *mouse* = m) (NCBI = *National Center for Biotechnology Information Reference Sequence*: NM_008226.2) und für mHCN4 (NCBI *Reference Sequence*: NM_001081192.1) wurde freundlicher Weise von Prof. Dr. Ulrich Benjamin Kaupp (*Center of Advanced European Studies and Research*, Bonn) zur Verfügung gestellt. Die cDNA wurde in den Oozytenvektor pGemHEnew (Liman et al., 1992) integriert und im Wirt *Escherichia coli* vervielfältigt. Nach der Isolierung der Plasmid-DNA durch Lyse und Reinigung erfolgte die Linearisierung mit *SalI* (mHCN2) bzw. *BclI* (mHCN4). Aus der DNA wurde *in vitro* mit dem Kit mMESSAGE mMACHINE (Ambion®, Thermo Fischer Scientific Inc., Waltham, USA) cRNA transkribiert. Nach Reinigung durch eine LiCl-Fällung und Lösung in RNase-freiem H₂O wurde mittels NanoDrop die Konzentration der cRNA-Lösung bestimmt und auf eine Standardkonzentration von 200 ng/μl verdünnt. Diese molekularbiologischen Arbeiten wurden von Frau Karin Schoknecht und Prof. Thomas Zimmer (Institut für Physiologie II, Jena) durchgeführt. Für Immunfluoreszenzmessungen wurde eine HA (Hämagglutinin)-Sequenz (ISAYGITYPYDVDPYA) in die HCN2- und HCN4-DNA im Bereich des extrazellulären S3-S4-Linkers eingesetzt, um diese Untereinheiten mit anti-HA-Antikörpern markieren zu können (Chen et al., 2000). Die notwendigen Klonierungsarbeiten wurden von Dr. Gunter Ehrlich (Institut für Physiologie II, Jena) übernommen. Für die Koinjektion wurden die cRNAs von mHCN2 und mHCN4 in den molekularen Verhältnissen 1:10, 1:1 und 10:1 gemischt und bei Bedarf mit RNase-freiem H₂O verdünnt. Die cRNA wurde bei -80 °C gelagert.

3.2 Lösungen und Chemikalien

Oozyten-Ringerlösung (OR2): 82,5 mM NaCl; 5 mM HEPES (2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazinyl)-Ethansulfonsäure); 1 mM MgCl₂; 2 mM KCl; pH 7,5 mit NaOH

Kollagenasebad: OR2; 3 mg/ml Kollagenase A (Roche Diagnostics Deutschland GmbH, Mannheim, Deutschland)

Barth-Medium: 84 mM NaCl; 1 mM KCl; 2,4 mM NaHCO₃; 0,82 mM MgSO₄; 0,33 mM Ca(NO₃)₂; 0,41 mM CaCl₂; 7,5 mM TRIS (Tris(hydroxymethyl)-aminomethan); 750 mg/l Cefuroxim und 100.000 Units/l Penicillin; 100 mg/l Streptomycin; pH 7,4 mit HCl

Pipettenlösung: 120 mM KCl; 1 mM CaCl; 10 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH

Badlösung: 100 mM KCl; 10 mM EGTA (Ethylenglykol-bis(2-Aminoethylether)-N,N,N',N'-Tetraessigsäure); 10 mM HEPES; pH 7,2 mit KOH

Badlösung mit Ligand: Lösungen mit einer Konzentration von 0,01 - 100 µM cAMP wurden aus Badlösung und einem Natriumsalz des zyklisches 3',5'-Adenosinmonophosphats (Bestellnummer A6885, Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, USA) hergestellt. Der pH-Wert der Badlösung änderte sich durch Zugabe von cAMP nicht.

3.3 Pipettenherstellung

Zur Herstellung der Injektionspipetten wurden Borosilikatkapillaren (Hilgenberg GmbH, Malsfeld, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 2 mm und Innendurchmesser von 1,6 mm mit einem Pipettenziehgerät des Models P-97 Flaming/Brown (Sutter Instruments Company, Novato, USA) gezogen und danach mit Hilfe eines dünnen Metalldrahtes unter dem Mikroskop abgebrochen, um eine kanülenartige Spitzenform zu erhalten. Injektionspipetten mit einer Öffnung von 6 - 12 µm wurden verwendet.

Zur Herstellung der Messpipetten wurden 7,5 cm lange Quarzglaskapillaren (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 1 mm und Innendurchmesser von 0,7 mm mit einem Pipettenziehgerät des Typs P-2000 Laser Based (Sutter Instruments Company, Novato, USA) in zwei Arbeitsgängen gezogen. Zur Messung wurden Pipetten mit Widerständen von 0,8 - 2,4 MΩ verwendet.

3.4 Oozytenpräparation

Die Oozyten für die *Patch-Clamp*-Experimente wurden durch Entnahme aus südafrikanischen Krallenfröschen *Xenopus laevis* gewonnen. Vor dem chirurgischen Eingriff wurden die Frösche mit 0,1 % Tricainlösung (Ethyl-3-Aminobenzoat, E10521, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim, Deutschland) narkotisiert. Die Oozyten wurden nach der Entnahme für 105 min bei 20 °C im Kollagenasebad (siehe Kapitel 3.2) geschwenkt und anschließend mit Pinzetten von der Follikelmembran befreit. Die Lagerung bis zur cRNA-Injektion erfolgte in Barth-Medium (siehe Kapitel 3.2) bei 18 °C. Die Operation erfolgte im Einklang mit dem deutschen Tierschutzgesetz und wurde vom Thüringer Landesamt für Verbraucherschutz am 30.08.2013 genehmigt.

Fünf bis zwölf Stunden nach Entfernung der Follikelmembran wurde zur heterologen Expression der mHCN-Kanäle cRNA (90 - 130 ng/μl) in die Oozyten injiziert. Bei kürzeren Abständen zwischen Entfernung der Follikelmembran und Injektion der RNA überlebten weniger Oozyten die Injektion. Zur Injektion wurde die RNA-Lösung in eine Injektionspipette (siehe Kapitel 3.3) überführt. Diese wurde mittels Mikromanipulator in die Oozyte eingestochen und 80 - 130 nl cRNA über per Hand applizierten Druck in die Oozyte injiziert. Die resultierende cRNA-Menge pro Zelle betrug 7 - 17 ng cRNA. Es wurden nur große, reife Oozyten (Reifestadium V und VI nach Dumont (1972)) verwendet. Nach Injektion von cRNA des mHCN4 wurden die Oozyten in Barth-Medium für fünf Tage bei 18 °C in nicht-sterilen 24-Well-Zellkultur-Platten im Kühlbrutschrank inkubiert. Nach Injektion von cRNA des mHCN2 und Koinjektion der cRNAs von mHCN2 und mHCN4 wurden die Oozyten auf gleiche Weise für drei bis vier Tage inkubiert. Das Barth-Medium wurde bei makroskopischer Verschmutzung des Mediums oder spätestens alle zwei Tage gewechselt.

3.5 Patch-Clamp-Messplatz

Der Messplatz wurde auf einen schwingungsgedämpften Tisch montiert und war durch einen Faraday-Käfig elektrisch von der Umgebung abgeschirmt. Er bestand aus einem inversen Mikroskop Axiovert 100 (Carl-Zeiss, Jena, Deutschland) mit Achroastigmat-Objektiven mit 5-facher und 10-facher Vergrößerung und einem Objektisch. Auf diesen wurde eine Messkammer montiert. Als Boden der Messkammer diente ein Deckgläschen.

Das Zuflusssystem wurde aus sieben gekürzten Kanülen aus Chrom-Nickelstahl (B. Braun Melsungen AG, Melsungen, Deutschland) mit einem Außendurchmesser von 0,6 mm angefertigt. Als Vorratsbehälter für die verschiedenen Badlösungen dienten 50-ml-Spritzen. Die Vorratsbehälter wurden über dünne Kunststoffschläuche aus PTFE (Polytetrafluorethylen) mit den Metallröhrchen des Zuflusssystems der Messkammer verbunden. Um Messungen im Badlösungsstrom zu ermöglichen, wurde ein Abflusssystem mit einer Pumpe des Modells Meredos (FMI Föhr Medical Instruments GmbH, Egelsbach, Deutschland) und einem Auffangbehälter installiert.

Pipettenhalter und Vorverstärker des Axopatch 200B (CV 203BU Headstage) wurden auf einen Mikromanipulator (Unit MRE/MLE (3 axes Mini 25)) mit Fernsteuereinheit SM1 (Luigs & Neumann Feinmechanik und Elektrotechnik GmbH, Ratingen, Deutschland) montiert. Über eine seitliche Öffnung wurde der Pipettenhalter über einen flexiblen Kunststoffschlauch und einen Dreiwegehahn mit einer 5-ml-Spritze verbunden. Über die Spritze konnte der Druck im Pipettenhalter verändert werden. Die Messkammer wurde mit einer Kaltlichtquelle vom Typ KL 1500 (Schott, Jena Deutschland) beleuchtet. Als Badelektrode wurde ein Silberchloridpellet (Science Products GmbH, Hofheim, Deutschland) verwendet. Die Pipettenelektrode bestand aus einem chlorierten Silberdraht. Das Signal des Vorverstärkers wurde zu einem Verstärker des Typs Axopatch 200B (Axon Instruments Inc., Union City (CA), USA) weitergeleitet. Vom Verstärker wurde das Signal nach Filterung mit einem 4-poligen 5-kHz-Tiefpass-Besselfilter durch einen Analog-Digitalwandler (MFK, Niederhausen, Deutschland) verarbeitet. Mit Hilfe des Programms ISO2 (MFK, Niederhausen, Deutschland) wurden die Signale mit einer Frequenz von 500 Hz aufgezeichnet und auf einem Bildschirm angezeigt.

3.6 Patch-Clamp-Experimente

Direkt vor den Messungen wurden die Oozyten in Badlösung (siehe Kapitel 3.2) unter einem Mikroskop mit Hilfe von Pinzetten von ihrer Vitellinmembran befreit, sodass die Zellmembran frei lag. Mit einer Glaspipette wurde die Oozyte in die mit Badlösung gefüllte Messkammer überführt. Die Messpipetten wurden mit einem Mikrofilament (MikroFil 34 Gauge, 6 mm lang von World Precision Instruments Inc., Sarasota, USA) soweit befüllt, dass die Pipettenelektrode gerade in die Flüssigkeit eintauchte. Dabei wurde die Pipettenlösung (siehe Kapitel 3.2) durch einen Spritzenvorsatzfilter mit einer Porengröße von

0,2 μm (Sartorius Stedim Biotech S.A., Aubagne Cedex, Frankreich) in das Mikrofilament filtriert.

Die Messungen wurden an Membran-Patches in zwei Konfigurationen durchgeführt: mit zellanhaltender Pipette (*Cell-attached*-Konfiguration) und am herausgelösten Patch (*Inside-out*-Konfiguration). In der *Cell-attached*-Konfiguration ist der HCN-Kanal vom intrazellulären Milieu der Oozyte beeinflusst. In der *Inside-out*-Konfiguration kann im Gegensatz dazu das Milieu an der intrazellulären Membranseite durch Applikation verschiedener Lösungen variiert werden (Bild 3.1). Voraussetzung für beide Messkonfigurationen ist eine stabile und dichte Verbindung zwischen Messpipette und Oozytenmembran, die aufgrund ihres hohen elektrischen Widerstandes *Gigaseal* genannt wird. Um optimale Bedingungen für die Ausbildung eines *Gigaseals* zu schaffen, wurde vor dem Eintauchen in die Badlösung ein Überdruck in der Messpipette angelegt und erst kurz vor Kontakt der Messpipette mit der Oozytenmembran entlassen. Wenn nötig wurde nach Kontakt der Messpipette mit der Zellmembran ein leichter Unterdruck angelegt. Um die *Inside-out*-Konfiguration zu erreichen wurde nach Ausbildung eines *Gigaseals* durch schnelles Zurückfahren der Messpipette ein Membranstück aus der Zellmembran der Oozyte herausgerissen. Für Messungen unter Ligandeneinfluss wurde die Messpipette vor ein Zuflussrohr direkt im Lösungsstrom platziert.

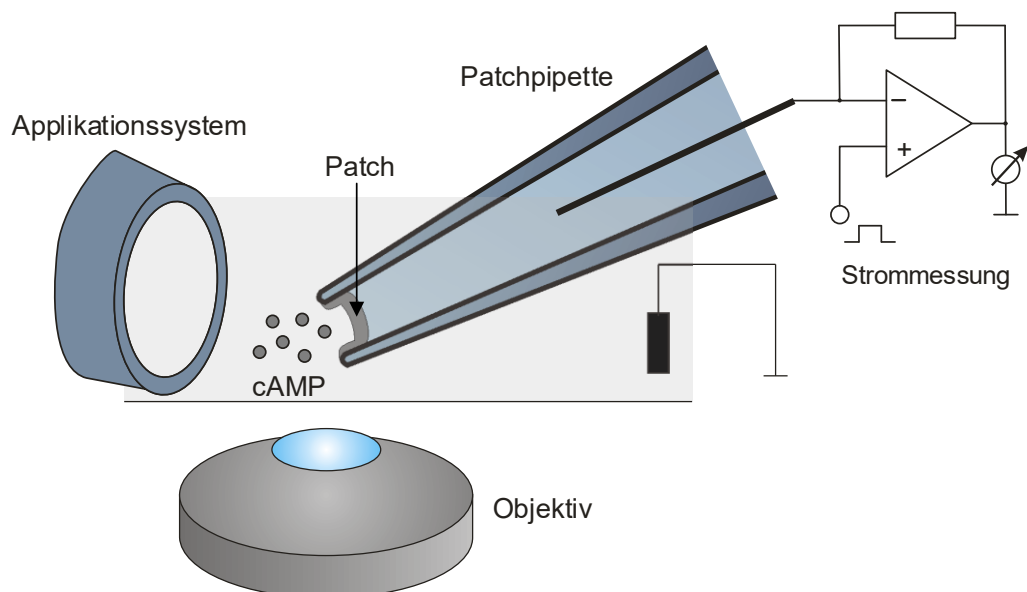


Bild 3.1: Messung in der *Inside-out*-Konfiguration

Skizziert ist der Messaufbau für ein *Patch-Clamp*-Experiment in der *Inside-out*-Konfiguration. Über das Applikationssystem wurde cAMP angespült. Mit Hilfe eines inversen Mikroskops wurde der Patch im Lösungsstrom positioniert.

Bei *Patch-Clamp*-Experimenten an HCN-Kanälen tritt nach dem Exzidieren von *Patches* und langen *Whole-Cell*-Messungen eine Abnahme der Stromamplitude und Verschiebung der Kanalaktivierung hin zu negativeren Membranpotentialen auf. Dieses Phänomen wird als *Rundown* bezeichnet (DiFrancesco et al., 1986). Es beruht wahrscheinlich auf dem Verlust zytosolischer Modulatoren, wie Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP₂) (Pian et al., 2006). Um ein neues Gleichgewicht nach Ablauf des *Rundown* zu erreichen, wurde in der vorliegenden Arbeit sowohl in der *Inside-out*- als auch in der *Cell-attached*-Konfiguration eine Wartezeit von 3,5 Minuten zwischen Exzidieren des *Patches* bzw. Ausbilden des *Gigaseals* und Messbeginn eingehalten (Lyashchenko und Tibbs, 2008).

3.6.1 Messprotokoll

Die *Patch-Clamp*-Messungen wurden mit Hilfe des Programms ISO2 durchgeführt und aufgezeichnet. Ausgehend von einem Haltepotential von -30 mV nahe des Ruhemembranpotentials der Oozyte bei dem der HCN-Kanal geschlossen ist, wurde eine Spannungsserie von -50 mV bis -160 mV in 10 mV-Schritten über dem *Patch* angelegt (Bild 3.2). Die Kommandospannung wurde solange geklemmt, bis sich die Kanalaktivierung im Gleichgewicht befand und somit die maximale Öffnung für dieses Membranpotential erreicht wurde. Für den HCN2-Kanal und die heteromeren HCN24-Kanäle betrug die Pulsdauer 4 s, für den HCN4-Kanal 8 s. Nach Erreichen des Gleichgewichtszustandes wurde für 500 ms eine Testspannung von -100 mV angelegt, um die Kanalaktivierung unabhängig vom elektrochemischen Gradienten aufzuzeichnen. Anschließend wurde wieder auf das Haltepotential geklemmt. Zwischen den Pulsen einer Spannungsserie bestand eine Pause von 6,5 s bei Anliegen des Haltepotentials, um die vollständige Inaktivierung der Kanäle sicher zu stellen.

Um die Belastung für die Membran durch lange Pulse und stark negative Kommandospannungen möglichst gering zu halten, wurden die Messprotokolle mit Hilfe von Vorversuchen möglichst genau auf das unterschiedliche spannungsinduzierte Aktivierungsverhalten der HCN-Isoformen und die verschiedenen Ligandenkonzentrationen angepasst.

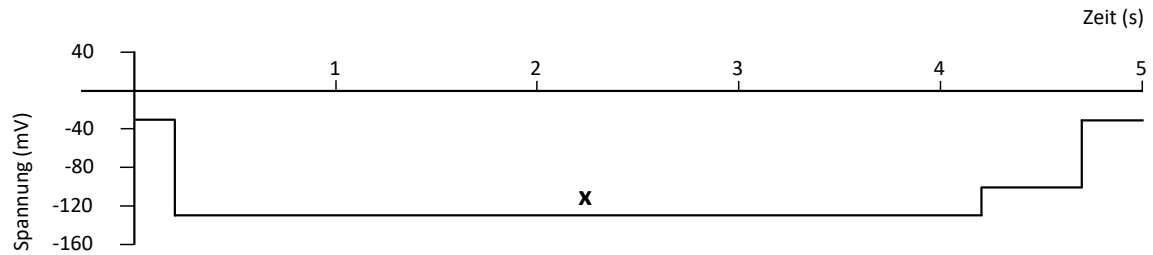


Bild 3.2: Messprotokoll

Von links nach rechts sind folgende Abschnitte des Pulsprotokolls abgebildet: Haltepotential -30 mV, variable Kommandospannung (x), Testspannung -100 mV, Haltepotential -30 mV. Während des Anliegens des Haltepotentials ist der HCN-Kanal geschlossen. Während der variablen Kommandospannung wird der Kanal bei Überschreiten der Aktivierungsschwelle aktiviert und während der Testspannung wird die Kanalaktivierung unabhängig vom elektrochemischen Gradienten erfasst.

3.7 Datenanalyse

Um die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle zu beschreiben und zu vergleichen, wurden die effektive *Gating*-Ladung $z\delta$, die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0,5}$ und die Aktivierungszeitkonstante τ für jeden Kanal in der *Cell-attached*-Konfiguration und in der *Inside-out*-Konfiguration für jede Ligandenkonzentration bestimmt. Um den Einfluss des Liganden cAMP auf das Schaltverhalten der HCN-Kanäle zu beschreiben, wurde die Verschiebung der halbmaximalen Aktivierungsspannung durch den Liganden $\Delta V_{0,5}$ bestimmt sowie für jede Kommandospannung der Hill-Koeffizient H und die Ligandenkonzentration des halbmaximalen Effektes EC_{50} .

3.7.1 Bestimmung der Aktivierung im Gleichgewicht

Zur Beschreibung der spannungsinduzierten Aktivierung im Gleichgewicht wurden die Spannungsserien der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 sowie die der heteromeren Kanäle HCN24 bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen ausgewertet. Um die gemessenen Ströme unabhängig vom elektrochemischen Gradienten über dem *Patch* auswerten zu können, wurde der sogenannte *Tail*-Strom bei einer auf die variable Kommandospannung folgenden Testspannung von -100 mV quantifiziert (Bild 3.2). Alle *Tail*-Ströme wurden um den Leckstrom korrigiert, der bei einer nicht-aktivierenden Spannung gemessen und anschließend auf den Maximalstrom I_{\max} der jeweiligen Konzentration normiert wurde.

Zur Beschreibung der Spannungsabhängigkeit wurden im Programm OriginPro 8.1G (OriginLab Corp, Northampton (MA), USA) die normierten Stromamplituden gegen die Kommandospannungen aufgetragen (Bild 3.3) und eine modifizierte Boltzmann-Funktion (Gleichung 3.1) (Kusch et al., 2010) an die Kurve angepasst.

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{\frac{I}{I_{\max, \text{SättSp}}}}{\left(1 + e^{\left(\frac{z\delta F(V - V_{0,5})}{RT}\right)}\right)} \quad 3.1$$

Mit Hilfe der auf den maximalen Strom I_{\max} normierten Stromamplitude I/I_{\max} , des maximalen Stroms bei sättigender Spannung $I_{\max, \text{SättSp}}$, der Eulerschen Zahl e , der Faraday-Konstanten F , der Gaskonstanten R und der absoluten Temperatur T konnten die Spannung bei halbmaximaler Aktivierung $V_{0,5}$ und die effektive *Gating*-Ladung $z\delta$ bestimmt werden.

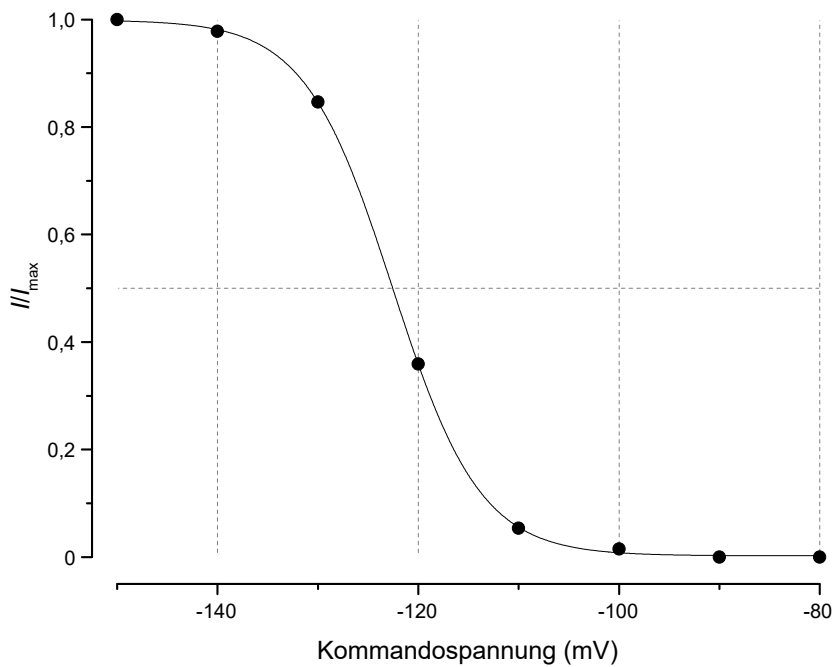


Bild 3.3: Aktivierungskurve für HCN2-Kanäle in Abwesenheit von cAMP

Dargestellt ist eine repräsentative Aktivierungskurve für HCN2-Kanäle in der *Inside-out*-Konfiguration. Die Kurve ist das Ergebnis einer Anpassung der Boltzmann-Funktion an die experimentellen Daten.

Zur Beschreibung der Ligandenabhängigkeit wurden die normierten Stromamplituden einer Kommandospannung gegen die Ligandenkonzentrationen aufgetragen und eine modifizierte Hill-Funktion (Gleichung 3.2) (Kusch et al., 2010) mit dem Programm OriginPro 8.1G an die experimentellen Daten angepasst.

$$\frac{I}{I_{\max}} = \frac{I}{I_{\max, 0cAMP}} + \frac{\left(\frac{I}{I_{\max, \text{SättcAMP}}} - \frac{I}{I_{\max, 0cAMP}} \right)}{\left(1 + \left(\frac{EC_{50}}{c} \right)^H \right)} \quad 3.2$$

Mit Hilfe der normierten Stromamplitude I/I_{\max} , dem Strom bei sättigender cAMP-Konzentration $I_{\max, \text{SättcAMP}}$, dem Strom ohne cAMP $I_{\max, 0cAMP}$ und der Konzentration des Liganden cAMP c konnten der Hill-Koeffizient H und die cAMP-Konzentration bei halbmaximalem Effekt EC_{50} ermittelt werden.

Die spannungsinduzierte Aktivierung im Gleichgewicht wird durch die Bindung des Liganden cAMP zu positiveren Spannungen verschoben. Um das Ausmaß dieser Verschiebung zu beschreiben, wurde $\Delta V_{0,5}$ berechnet. Dazu wurde von dem $V_{0,5}$ -Wert, gemessen in einer Badlösung mit cAMP, der $V_{0,5}$ -Wert, gemessen in einer Badlösung ohne cAMP, subtrahiert. Die berechneten Werte für $\Delta V_{0,5}$ wurden gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen und mit einer modifizierten Hill-Funktion (Gleichung 3.2) beschrieben.

3.7.2 Bestimmung der Aktivierungskinetik

Zur Beschreibung der spannungsinduzierten Aktivierungskinetik wurden die Stromkurven im Programm ISO2 mit einer monoexponentiellen Funktion (Gleichung 3.3) beschrieben.

$$I(t) = I_{\max} \times \left(1 - e^{\frac{-t}{\tau}} \right) \quad 3.3$$

τ ist die Aktivierungszeitkonstante. I_{\max} der maximale Strom.

3.7.3 Statistik

Die statistische Analyse der ermittelten Daten wurde mit dem Programm OriginPro 8.1G durchgeführt. Es wurden der t-Test für unabhängige Stichproben und die One-Way ANOVA verwendet. Dabei wurde die Irrtumswahrscheinlichkeit α (Signifikanzniveau) auf 5 % festgelegt. Für Mittelwerte wird der Standardfehler des arithmetischen Mittels (SEM) angegeben. Für Parameter, die durch Approximation einer Funktion an Mittelwertkurven bestimmt wurden, wird der Standardfehler (SD) angegeben. Fehlerfortpflanzungen wurden berücksichtigt.

4 Ergebnisse

4.1 Aktivierung im Gleichgewicht

Nach Koinjektion von mHCN2- und mHCN4-RNA konnten in *Patches* der Oozytenmembran robuste Ströme gemessen werden (Bild 4.1). Allerdings gab es Unterschiede in der Stromamplitude in Abhängigkeit vom RNA-Mischungsverhältnis. Injektion von HCN2-RNA allein sowie Injektion von HCN2- und HCN4-RNA im Mischungsverhältnis 10:1 und 1:1 führten zu vergleichbaren Stromamplituden. Nach Injektion von HCN2- und HCN4-RNA im Verhältnis 1:10 und Injektion von HCN4-RNA allein wurden wesentlich kleinere Stromamplituden beobachtet. Insgesamt traten die kleinsten Ströme nach alleiniger Injektion von HCN4-RNA auf. Bild 4.2 zeigt, dass diese Abhängigkeit sowohl für Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration, als auch für Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP und nach Applikation sättigender cAMP-Konzentration (10 μ M) gilt.

Um zu klären, ob die Ursache für die kleinen Stromamplituden der HCN4-Kanäle in einer geringeren Expressionsdichte zu suchen ist, wurden von Dr. Kusch und Dr. Ehrlich (Institut für Physiologie II, Jena) Immunofluoreszenz-Messungen durchgeführt. Dazu wurden die Kanalsequenzen mit einem HA-Tag im S3-S4-Linker versehen (siehe Kapitel 3.1) und dieser nach Kanalexpression mit Hilfe von fluorophorgekoppelten Antikörpern markiert. Interessanterweise unterschied sich die Fluoreszenzintensität bei alleiniger HCN4(HA)-Expression nicht signifikant von der Fluoreszenzintensität nach alleiniger HCN2(HA)-Expression (Bild 4.3). Nach Koinjektion von HCN4(HA)- und HCN2-RNA wurde das HCN4(HA)-Signal nicht durch die Anwesenheit von HCN2-Kanälen verringert. Da die Fluoreszenzintensität ein Ausdruck der Expressionsdichte ist, kann aus diesen Ergebnissen geschlossen werden, dass nach Injektion von HCN4-RNA allein und nach Koinjektion von HCN2- und HCN4-RNA HCN4-Kanäle im gleichen Maß in die Oozytenmembran eingebaut werden wie HCN2-Kanäle.

Die Ursache für die kleineren Stromamplituden nach Injektion von HCN4-RNA ist also eher bei einer geringeren Offenwahrscheinlichkeit oder einer geringeren Einzelkanalleitfähigkeit zu suchen. Alle homo- und heteromeren HCN-Kanäle wurden im gleichen Zeitraum gemessen. In allen Fällen wurde darauf geachtet, dass ähnlich große Pipettenwiderstände verwendet werden.

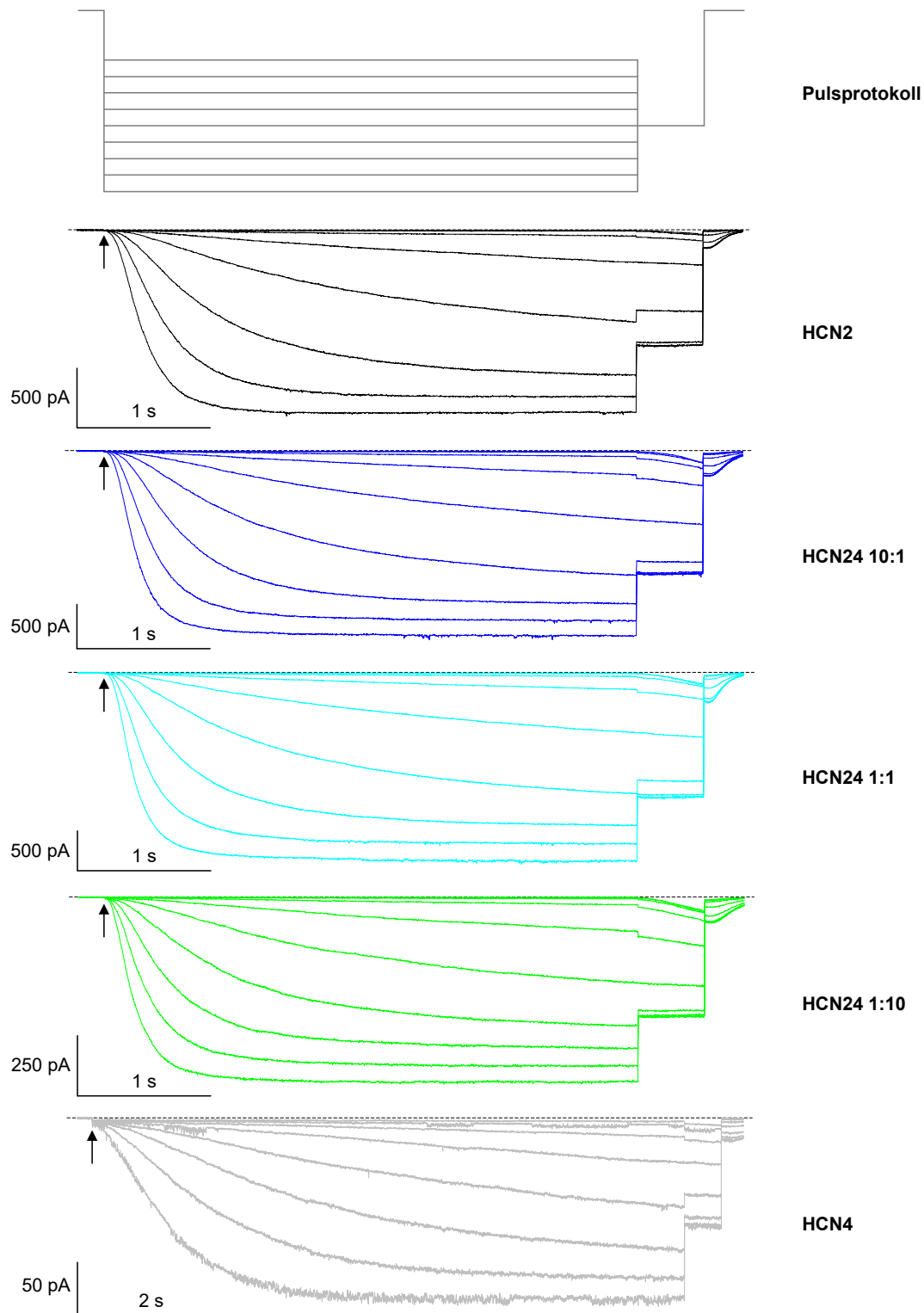


Bild 4.1: Spannungsserien aufgezeichnet in der *Cell-attached*-Konfiguration

Im Pulsprotokoll ist von links nach rechts dargestellt: Haltepotential von -30 mV für 200 ms, variable Kommandospannung im Bereich -60 bis -140 mV angelegt in 10 mV-Abständen für 4 s bzw. 8 s bei Messung des HCN4-Kanals, Testspannung -100 mV für 500 ms, Haltepotential -30 mV für 300 ms. Die Stromspuren zeigen jeweils eine repräsentative Beispielmessung für jede Kanalvariante. Folgende Kommandospannungen (Pfeil) wurden angelegt: für HCN2 -70 bis -140 mV, für HCN24 10:1 -60 bis -140 mV, für HCN24 1:1 -60 bis -140 mV, für HCN24 1:10 -60 bis -140 mV, HCN4 -70 bis -140 mV.

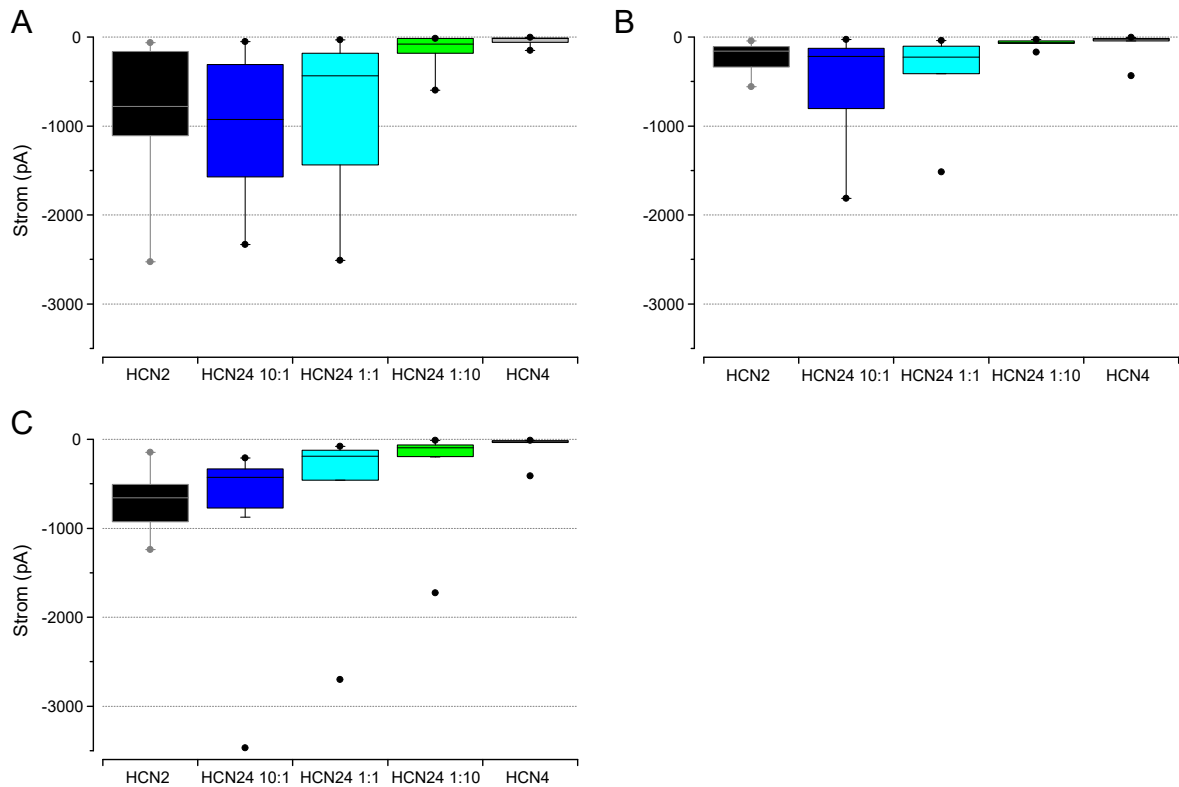


Bild 4.2: Stromamplituden aller gemessenen Kanalvarianten

Dargestellt sind die Amplituden der *Tail*-Ströme nach einem Spannungspuls von -130 mV ($n = 7 - 16$). A) Amplituden der *Cell-attached*-Konfiguration B) Amplituden der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP C) Amplituden der *Inside-out*-Konfiguration mit sättigender cAMP-Konzentration (10 μ M).

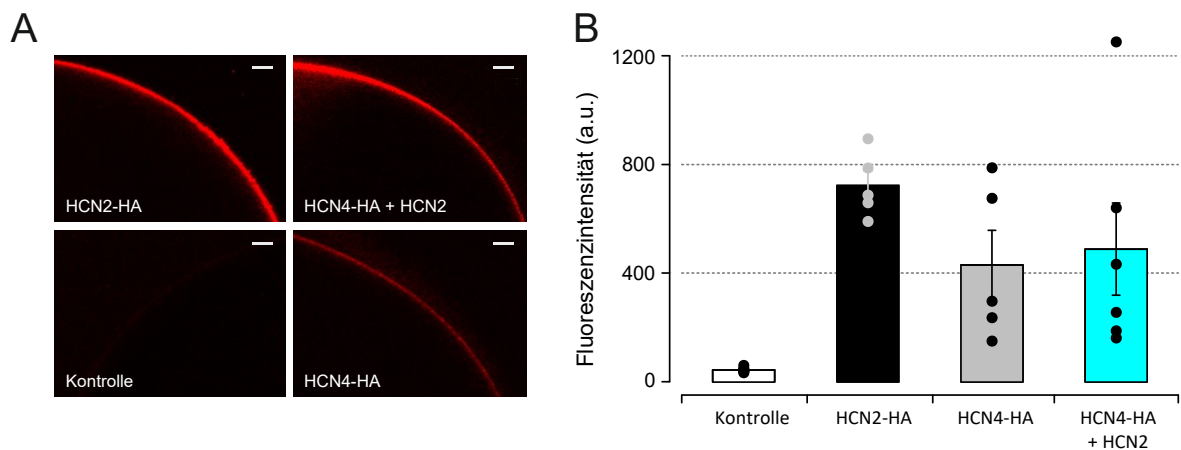


Bild 4.3: Membranexpression HA-markierter HCN-Kanäle in *Xenopus laevis* Oozyten

A) Konfokale Bilder von ausgewählten HCN2(HA)-, HCN4(HA)- bzw. HCN4(HA) + HCN2-exprimierenden Oozyten. HA-tragende Kanalproteine wurden mit primären anti-HA-Antikörpern (IgG) und sekundären Alexa633-gekoppelten anti-IgG-Antikörpern markiert (Balken = 5 μ M). B) Das Säulendiagramm zeigt die mittleren Fluoreszenzintensitäten. Die individuellen Messungen sind als schwarze bzw. graue Symbole dargestellt. Modifiziert nach Kusch et al., 2013

Zur Beschreibung der spannungsinduzierten Aktivierung im Gleichgewicht wurden für alle untersuchten Kanalvarianten (Bild 4.1) in allen Messkonfigurationen Gleichgewichts-Aktivierungskurven (siehe Bild 3.3) durch Approximation einer modifizierten Boltzmann-Funktion (siehe Gleichung 3.1) bestimmt, wodurch für jede Messung $V_{0,5}$ und $z\delta$ ermittelt werden konnten. Alle Kanalvarianten wurden in der *Cell-attached*-Konfiguration, in der *Inside-out*-Konfiguration in Abwesenheit von cAMP und in der *Inside-out*-Konfiguration in Anwesenheit sechs verschiedener cAMP-Konzentrationen zwischen 0,01 μM und 10 μM untersucht.

In der *Cell-attached*-Konfiguration bleibt die Oozytenmembran intakt. Die HCN-Kanäle sind an ihrer intrazellulären Seite vom Zytosol der Oocyte umspült. In dieser Messkonfiguration zeigten die heteromeren Kanäle von den homomeren Kanälen abweichende Eigenschaften (Bild 4.4). Die heteromeren Kanäle öffneten bei stärker depolarisierenden Spannungen als die homomeren Kanäle HCN2 und HCN4. Die halbmaximale Aktivierungsspannung des HCN2-Kanals unterschied sich signifikant von den $V_{0,5}$ -Werten der Kanäle HCN24 1:10, HCN4 und HCN24 1:1. Der $V_{0,5}$ -Wert des HCN4-Kanals unterschied sich zusätzlich signifikant von dem $V_{0,5}$ -Wert des HCN24 1:10-Kanals. Die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0,5}$ betrug für die Kanäle: HCN2: $-104 \pm 1 \text{ mV}$, HCN24 10:1: $-99 \pm 2 \text{ mV}$, HCN24 1:1: $-100 \pm 1 \text{ mV}$, HCN24 1:10: $-96 \pm 1 \text{ mV}$ und HCN4: $-106 \pm 2 \text{ mV}$. Für eine Übersicht sind alle $V_{0,5}$ -Werte in Tabelle 8.1 der Zusatzmaterialien (siehe Kapitel 8.1) zusammengestellt.

Damit konnten die Ergebnisse, die mit Hilfe der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode erhoben wurden (Zhang et al., 2009; Fischer, 2012), in der *Cell-attached*-Konfiguration bestätigt werden (Bild 4.4). Die Parameter der spannungsinduzierten Aktivierung der heteromeren Kanäle lassen sich nicht durch eine Kombination der Eigenschaften der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 erklären, sondern nur durch die Expression funktioneller heteromerer HCN24-Kanäle.

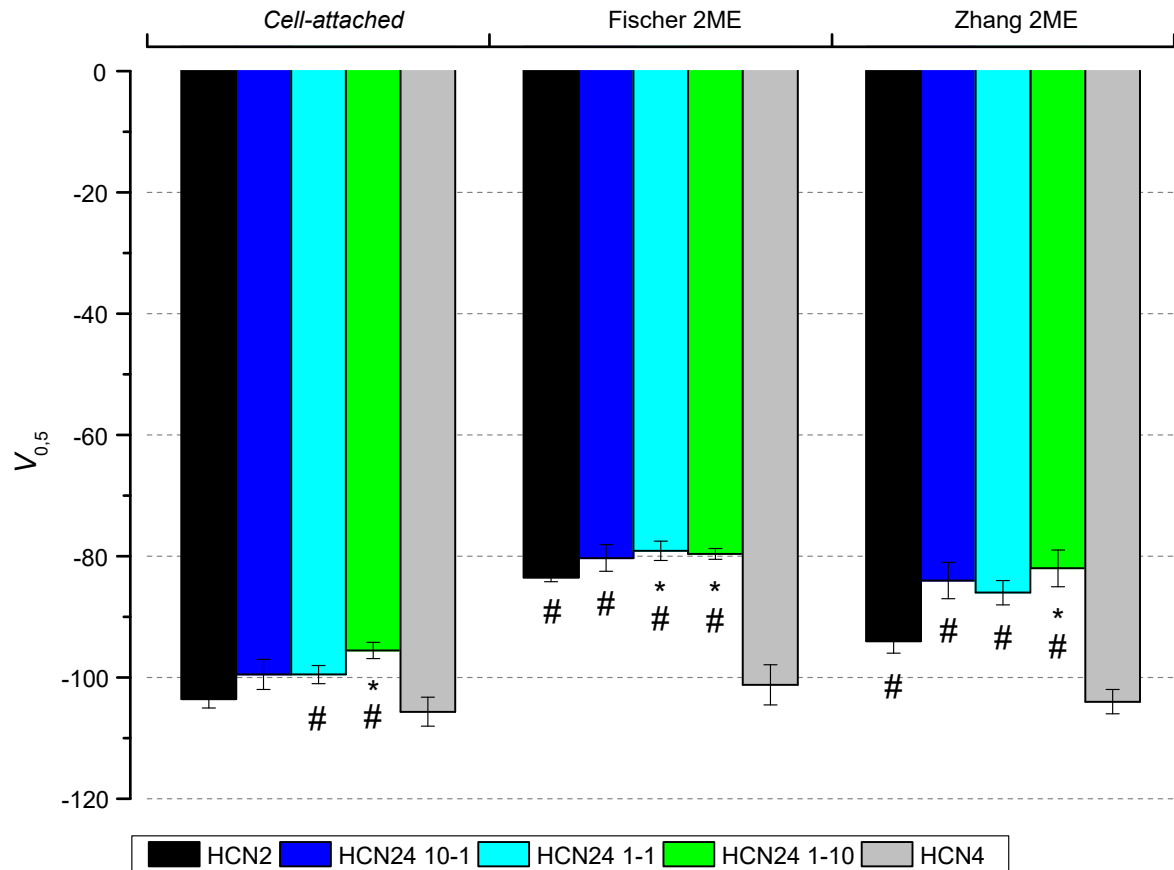


Bild 4.4: Halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0.5}$ für Messkonfigurationen mit intakter Oozyte

Dargestellt sind die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration (*Cell-attached*) ($n = 7 - 15$) im Vergleich zu den Messungen der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode von Fischer (Fischer 2ME) (Fischer, 2012) und den Messungen mit der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode von Zhang und Mitarbeitern (Zhang 2ME) (Zhang et al., 2009). Signifikante Unterschiede zwischen den $V_{0.5}$ -Werten der jeweiligen Messreihe wurden wie folgt markiert: * Vergleich mit HCN2-Kanälen; # Vergleich mit HCN4-Kanälen.

Durch das Exzidieren des *Patches* wird das Zytosol der Oozyten durch die Badlösung ersetzt. Von einer Badlösung umspült, die kein cAMP enthält, öffneten alle Kanalvarianten erst bei stärker hyperpolarisierenden Spannungen als in der *Cell-attached*-Konfiguration (Bild 4.5). Die $V_{0,5}$ -Werte verschoben sich um 17 bis 23 mV hin zu negativeren Spannungen. Die Eigenschaften der heteromeren Kanäle näherten sich denen der homomeren HCN2- und HCN4-Kanäle an. Die halbmaximale Aktivierungsspannung des HCN24 10:1-Kanals lag nun zwischen den $V_{0,5}$ -Werten der Kanäle HCN2 und HCN4. Die halbmaximale Aktivierungsspannung der HCN24 1:1- und HCN24 1:10-Kanäle blieb positiver als die der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4. Dabei unterschieden sich die $V_{0,5}$ -Werte der heteromeren Kanäle HCN24 1:1 und HCN24 1:10 signifikant von dem $V_{0,5}$ -Wert des HCN2-Kanals, aber nicht von dem $V_{0,5}$ -Wert des HCN4-Kanals. Auch die $V_{0,5}$ -Werte der heteromeren Kanäle HCN24 10:1 und HCN24 1:10 unterschieden sich signifikant voneinander. Die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0,5}$ betrug für die Kanäle: HCN2: -124 ± 1 mV, HCN24 10:1: -123 ± 1 mV, HCN24 1:1: -120 ± 2 mV, HCN24 1:10: -118 ± 1 mV und HCN4: -122 ± 2 mV.

Kann die Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte zu negativeren Spannungen nach dem Exzidieren des *Patches* durch Applikation einer sättigenden cAMP-Konzentration aufgehoben werden? Bei Messung der spannungsinduzierten Aktivierung am exzidierten *Patch* in einer Badlösung mit sättigender cAMP-Konzentration zeigten die homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 die gleichen $V_{0,5}$ -Werte wie bei Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen der heteromeren HCN-Kanäle blieben negativer als in der *Cell-attached*-Konfiguration (Bild 4.5). Dabei waren die Unterschiede der $V_{0,5}$ -Werte zwischen den Messkonfigurationen für die Kanäle HCN24 1:1 und HCN24 1:10 signifikant, für den HCN24 10:1-Kanal dagegen nicht. Im spannungsinduzierten Aktivierungsverhalten bei sättigender cAMP-Konzentration bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den Kanälen. Der $V_{0,5}$ -Wert betrug für die Kanäle: HCN2: -104 ± 1 mV, HCN24 10:1: -102 ± 2 mV, HCN24 1:1: -105 ± 1 mV, HCN24 1:10: -106 ± 1 mV und HCN4: -106 ± 2 mV.

Das Verhältnis der halbmaximalen Aktivierungsspannung heteromerer und homomerer HCN-Kanäle in der *Cell-attached*-Konfiguration änderte sich nach dem Exzidieren des *Patches*. In allen Fällen kam es zu einer Verschiebung der Aktivierungskurve in Richtung negativere Spannungen. Interessanterweise konnte diese Verschiebung in homomeren Kanälen durch die Applikation einer sättigenden cAMP-Konzentration aufgehoben wer-

den, während eine derartige Rückverschiebung zu weniger negativen Spannungen in allen heteromeren Kanälen nur unvollständig blieb.

Das Zytosol der Oozyte enthält ca. 1 μM cAMP (Maller et al., 1979). Deshalb kann davon ausgegangen werden, dass die Bindungsstellen der HCN-Kanäle in der *Cell-attached*-Konfiguration zu einem hohen Grad mit Liganden besetzt sind. Die beschriebenen Unterschiede könnten also im Wesentlichen von einer Auswaschung (*Cell-attached*-Konfiguration zu *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP) und einer erneuten Einwaschung des Liganden (*Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP zu *Inside-out*-Konfiguration mit cAMP) herrühren, wobei eventuell weitere zytosolische oder membranständige Komponenten eine Rolle spielen.

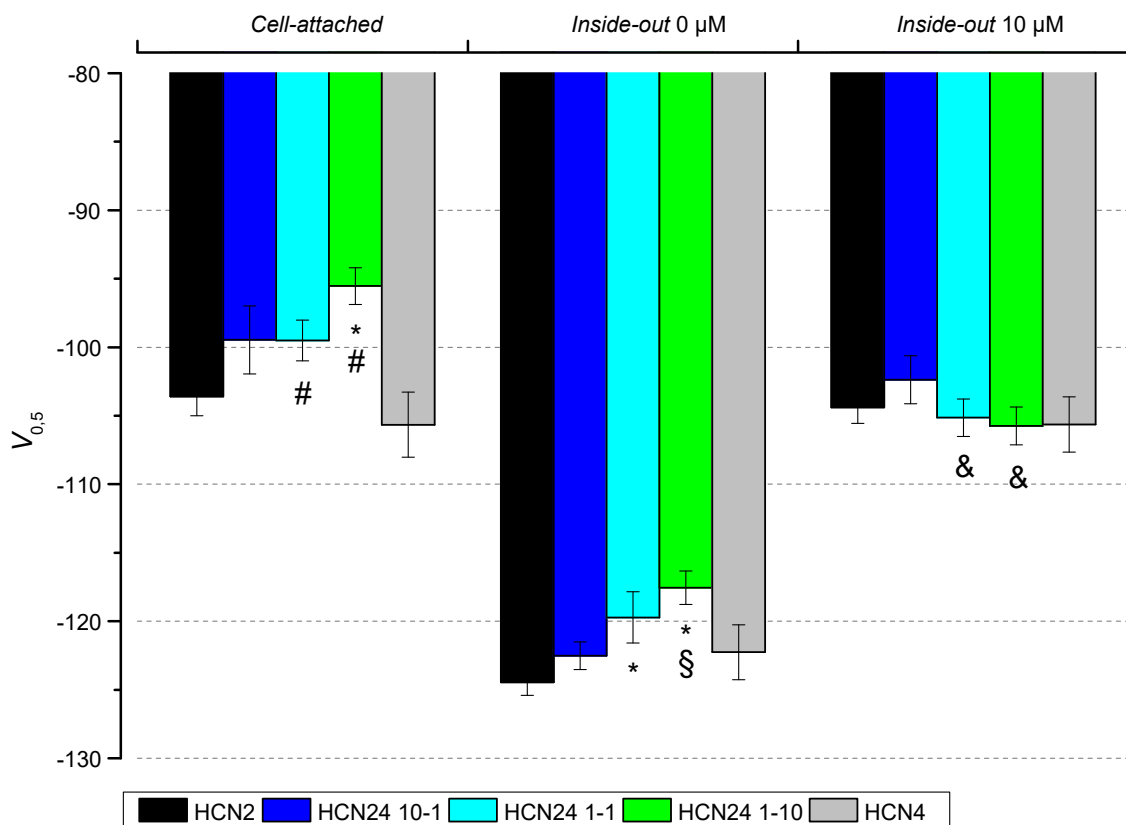


Bild 4.5: Halbmaximale Aktivierungsspannungen $V_{0,5}$ im Vergleich

Dargestellt sind die Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration im Vergleich zu den Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP (0 μM) und mit der maximalen Konzentration von 10 μM cAMP (10 μM) in der Badlösung ($n = 7 - 16$). Signifikante Unterschiede zwischen den $V_{0,5}$ -Werten der jeweiligen Messreihe wurden wie folgt markiert: * Vergleich mit dem HCN2-Kanal; # Vergleich mit dem HCN4-Kanal; § Vergleich mit dem HCN24 10:1-Kanal. Mit & wurden signifikante Unterschiede zwischen den $V_{0,5}$ -Werten der *Cell-attached*-Konfiguration und der *Inside-out*-Konfiguration mit 10 μM cAMP eines Kanals markiert.

Um herauszufinden, ob die elektrophysiologischen Eigenschaften der homomeren und heteromeren HCN-Kanäle durch subsättigende cAMP-Konzentrationen unterschiedlich beeinflusst werden, wurden Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration mit fünf subsättigenden cAMP-Konzentrationen durchgeführt.

Die Aktivierungskurven aller Kanäle wurden durch cAMP zu positiveren Spannungen verschoben. Dieser Zusammenhang ist in Bild 4.6 stellvertretend für alle Kanalvarianten am HCN2-Kanal dargestellt.

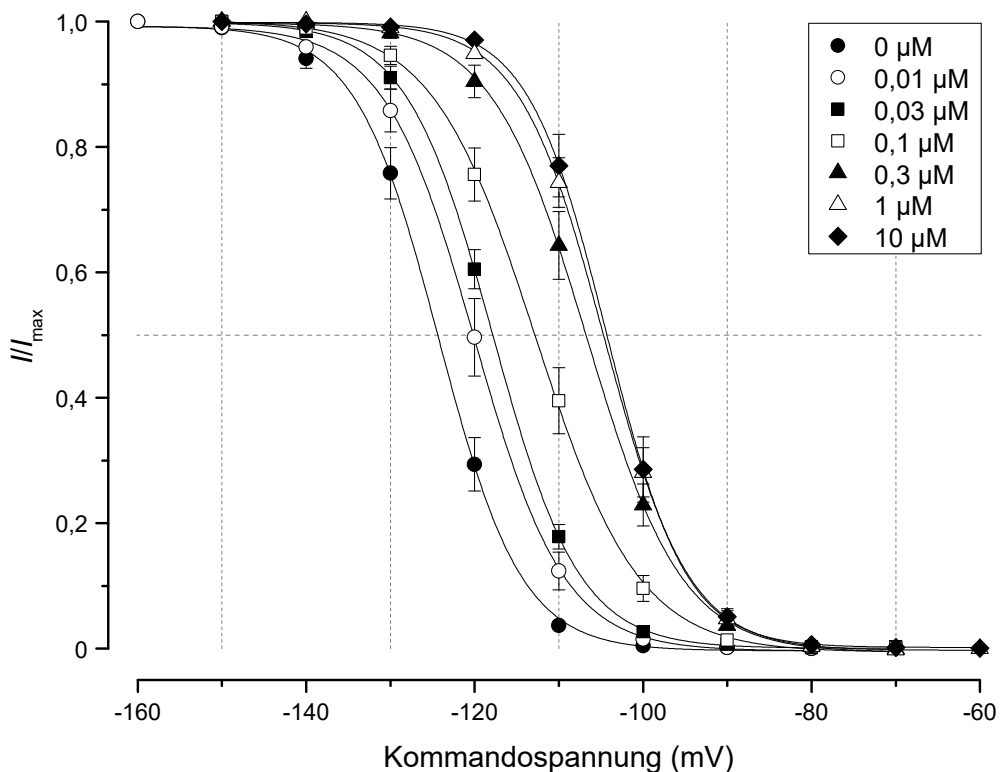


Bild 4.6: Rechtsverschiebung der Aktivierungskurve durch cAMP

Dargestellt sind die Mittelwerte der Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration mit unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen für den HCN2-Kanal ($n = 9 - 13$).

Unter Einwirkung geringer cAMP-Konzentrationen glichen sich die $V_{0,5}$ -Werte der homomeren und heteromeren Kanäle einander an. Es bestand kein signifikanter Unterschied zwischen den halbmaximalen Aktivierungsspannungen aller Kanalvarianten, die mit $0,01 \mu\text{M}$ bzw. $0,03 \mu\text{M}$ cAMP gemessen wurden. Ab einer cAMP-Konzentration von $0,1 \mu\text{M}$ unterschieden sich die $V_{0,5}$ -Werte der homomeren HCN2- und HCN4-Kanäle signifikant voneinander mit $-113 \pm 1 \text{ mV}$ und $-118 \pm 2 \text{ mV}$. Die $V_{0,5}$ -Werte der Heteromere HCN24 10:1, HCN24 1:1 und HCN24 1:10 lagen bei dieser cAMP-Konzentration zwischen denen der homomeren Kanäle mit $-116 \pm 2 \text{ mV}$, $-116 \pm 2 \text{ mV}$ und $-115 \pm 1 \text{ mV}$. Dabei unterschieden sie sich nicht signifikant voneinander und von den $V_{0,5}$ -Werten der

homomeren Kanäle. Mit zunehmenden cAMP-Konzentrationen öffneten die homomeren HCN2- und die heteromeren HCN24-Kanäle bei positiveren Spannungen. Die Aktivierung des HCN4-Kanals hingegen veränderte sich kaum. Die Aktivierungskurven der heteromeren Kanäle lagen zwischen denen der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4, wobei der Abstand zum HCN2-Kanal kleiner war als der zum HCN4-Kanal. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen der heteromeren Kanäle unterschieden sich unter dem Einfluss der meisten Ligandenkonzentrationen nicht signifikant voneinander. Signifikante Unterschiede zwischen den $V_{0,5}$ -Werten der heteromeren Kanäle bestanden lediglich in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP und mit 0,3 μM cAMP in der Badlösung für die $V_{0,5}$ -Werte der Heteromere HCN24 10:1 und HCN24 1:10 (Bild 4.7). Für eine Übersicht sind alle $V_{0,5}$ -Werte in Tabelle 8.1 der Zusatzmaterialien (siehe Kapitel 8.1) zusammengestellt.

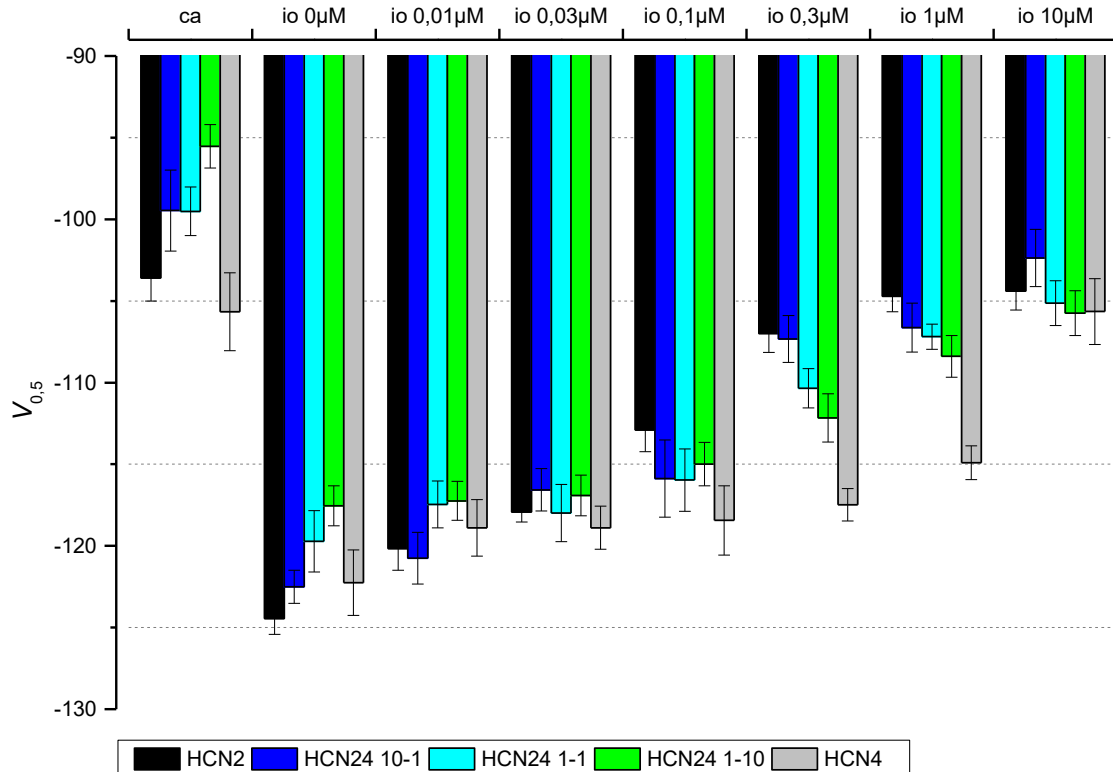


Bild 4.7: Halbmaximale Aktivierungsspannungen $V_{0,5}$ aller Messkonfigurationen

Dargestellt sind die $V_{0,5}$ -Werte der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 und der heteromeren Kanäle HCN24 10:1, HCN24 1:1 und HCN24 1:10, berechnet aus Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration (ca) sowie *Inside-out*-Konfiguration (io) bei unterschiedlichen cAMP-Konzentrationen ($n = 7 - 16$).

Die beschriebenen cAMP-abhängigen Änderungen der $V_{0,5}$ -Werte lassen sich in einer Konzentrations-Wirkungs-Kurve darstellen. Dabei ist die Wirkung $\Delta V_{0,5}$ als Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte nach cAMP-Applikation in Bezug auf den $V_{0,5}$ -Wert bei Abwesenheit von cAMP definiert (Bild 4.8). Die $V_{0,5}$ -Werte aller Kanäle wurden mit den gleichen Ligandenkonzentrationen untersucht.

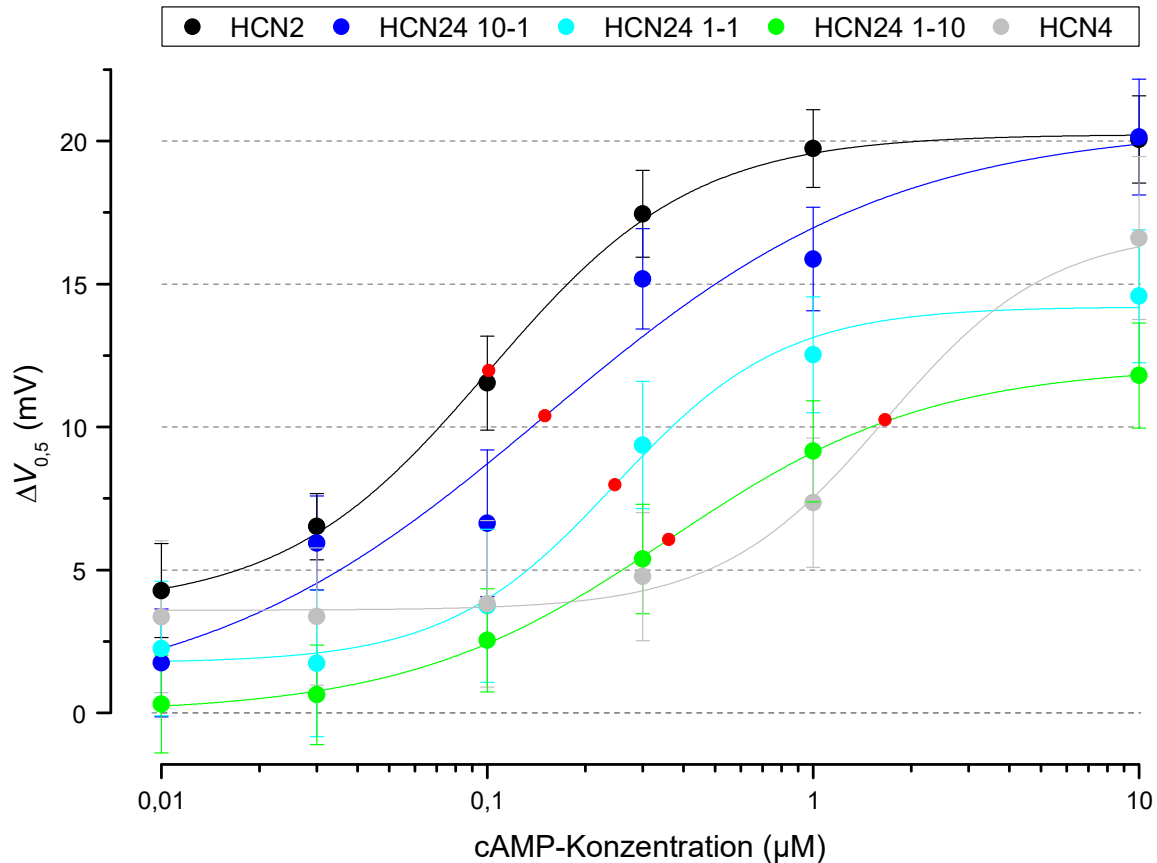


Bild 4.8: Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte in Abhängigkeit von der cAMP-Konzentration

Die cAMP-Konzentration des halbmaximalen Effektes EC_{50} ist auf jeder Kurve als rotes Symbol dargestellt ($n = 7 - 16$).

An die Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte $\Delta V_{0,5}$ wurde die Hill-Funktion (siehe Gleichung 3.2) angepasst. Damit konnten für alle Kanalvarianten die Ligandenkonzentration des halbmaximalen Effekts EC_{50} und für alle Kanalvarianten mit Ausnahme des HCN4-Kanals der Hill-Koeffizient H ermittelt werden. Die Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte $\Delta V_{0,5}$ des HCN4-Kanals lässt offen, ob mit 10 μM tatsächlich eine sättigende Konzentration erreicht werden konnte. Ein durchgeführter Vergleich der Stromamplitude beim Wechsel der Badlösung von 10 μM auf 100 μM cAMP (nicht signifikanter Zuwachs um 3,9 % ($n = 7$)) zeigte allerdings, dass die Stromamplitude nicht zunimmt. Das lässt darauf schließen, dass eine Konzentration von 10 μM auch für HCN4-Kanäle als sättigend angenommen werden kann. Weiterhin wird diese Annahme durch einen Vergleich der in den vorliegenden Experimen-

ten erreichten Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte um 17 ± 3 mV mit veröffentlichten Daten gestützt. Seifert und Mitarbeiter beobachteten eine maximale Verschiebung der $V_{0,5}$ -Werte des HCN4-Kanals durch cAMP um 11 mV, Ludwig und Mitarbeiter um 15 mV und Altomare und Mitarbeiter um 16 mV (Seifert et al., 1999; Ludwig et al., 1999; Altomare et al., 2003). Der EC_{50} -Wert der Aktivierungskurvenverschiebung nahm mit zunehmendem Anteil injizierter HCN4-RNA zu. Das heißt, die scheinbare Affinität für cAMP nahm mit dem Anteil der injizierten HCN4-RNA ab. Dabei lag der EC_{50} -Wert des Heteromers HCN24 10:1 nahe am EC_{50} -Wert des HCN2-Kanals. Die Werte der heteromeren Kanäle HCN24 1:1 und HCN24 1:10 lagen zwischen denen der homomeren HCN-Kanäle und dabei näher am HCN2-Kanal.

Die maximale Verschiebung der Aktivierungskurve durch cAMP war für die Kanäle HCN2 und HCN24 10:1 am größten mit je 20 ± 2 mV, gefolgt vom HCN4-Kanal mit 17 ± 3 mV. Die Aktivierungskurve des HCN24 1:10-Kanals verschob sich durch die Einwirkung von cAMP am geringsten mit 12 ± 2 mV (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: EC_{50} , H und die maximale Verschiebung der Aktivierungskurve durch cAMP $\Delta V_{0,5 \max}$ aller Kanäle

	HCN2	HCN24 10:1	HCN24 1:1	HCN24 1:10	HCN4
EC_{50} (μM)	$0,10 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,06$	$0,36 \pm 0,02$	$1,7 \pm 0,8$
H	$1,4 \pm 0,9$	$0,8 \pm 0,5$	$1,7 \pm 0,7$	$1,08 \pm 0,05$	$1,7 \pm 1,3$
$\Delta V_{0,5 \max}$ (mV)	20 ± 2	20 ± 2	15 ± 2	12 ± 2	17 ± 3

Eine weitere Möglichkeit, die scheinbare Affinität zu quantifizieren, ist die Erstellung einer Konzentrations-Wirkungs-Beziehung anhand der relativen Stromamplituden bei variierender cAMP-Konzentration. Diese Darstellung erlaubt die Untersuchung des Einflusses der Spannung auf die scheinbare Affinität. An jede Konzentrations-Wirkungs-Beziehung (Bild 4.9) wurde die Hill-Funktion (siehe Gleichung 3.2) angepasst. So konnten für jede Spannung die Ligandenkonzentration der halbmaximalen Aktivierung EC_{50} und der Hill-Koeffizient H ermittelt werden. Eine derartige Konzentrations-Wirkungs-Beziehung für den HCN4-Kanal konnte aufgrund der geringen mechanischen Stabilität der *Patches* mit homomeren HCN4-Kanälen, die auf eine ca. zwei Tage längere Inkubationszeit zurückzuführen ist, nicht erstellt werden.

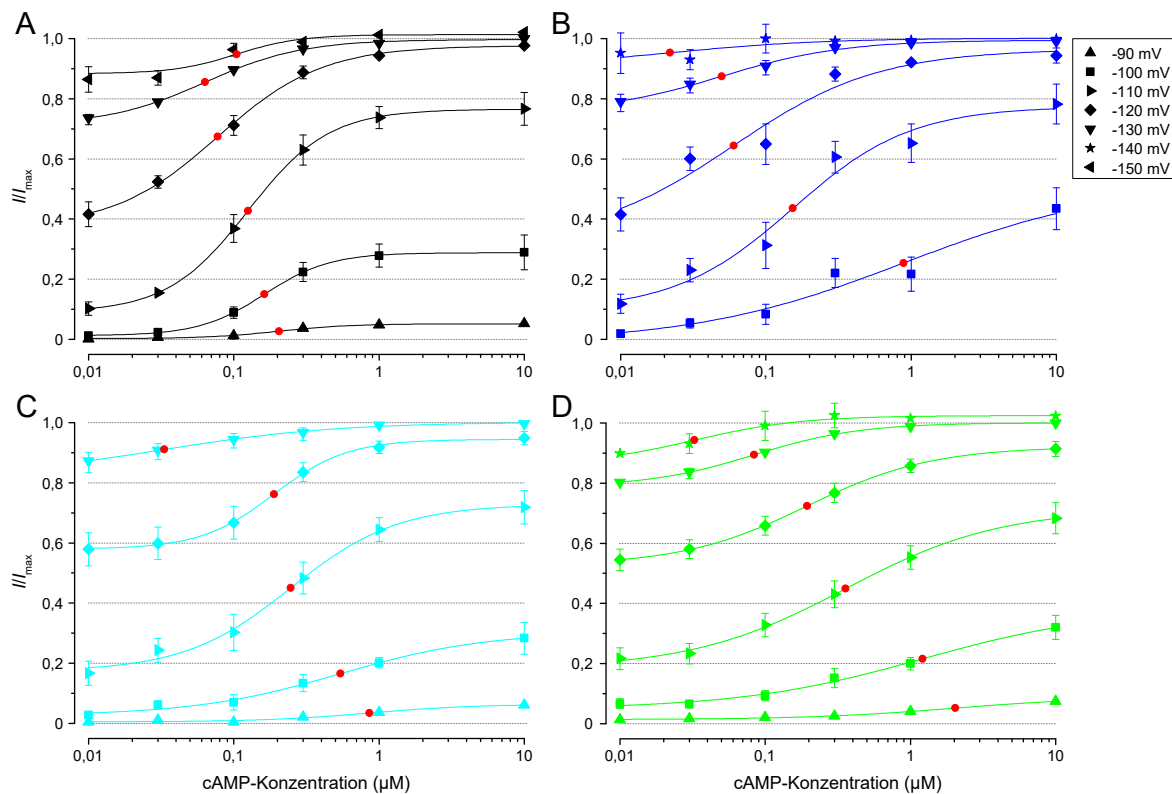


Bild 4.9: Dosis-Wirkungs-Kurven für cAMP bei unterschiedlichen Spannungen

Dargestellt ist der normierte Strom jeder Spannung in Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Der EC_{50} -Wert für jede Spannung ist durch eine rote Symbol auf der Kurve gekennzeichnet ($n = 7 - 15$). A) HCN2-Kanal B) HCN24 10:1-Kanal C) HCN24 1:1-Kanal D) HCN24 1:10-Kanal

Mit stärker hyperpolarisierender Spannung nahmen die EC_{50} -Werte aller Kanalvarianten ab. Bei stärker depolarisierender Spannung im Bereich der Aktivierungsgrenze der HCN-Kanäle ist der Einfluss des cAMP auf die Aktivierung sehr verschieden (Bild 4.10). Die zum Erreichen der halbmaximalen Aktivierung benötigte cAMP-Konzentration nahm bei gleicher Spannung mit steigendem Anteil der HCN4-RNA an der gesamten injizierten

RNA zu. Für eine Übersicht sind alle EC_{50} -Werte in Tabelle 8.3 der Zusatzmaterialien (siehe Kapitel 8.1) zusammengestellt.

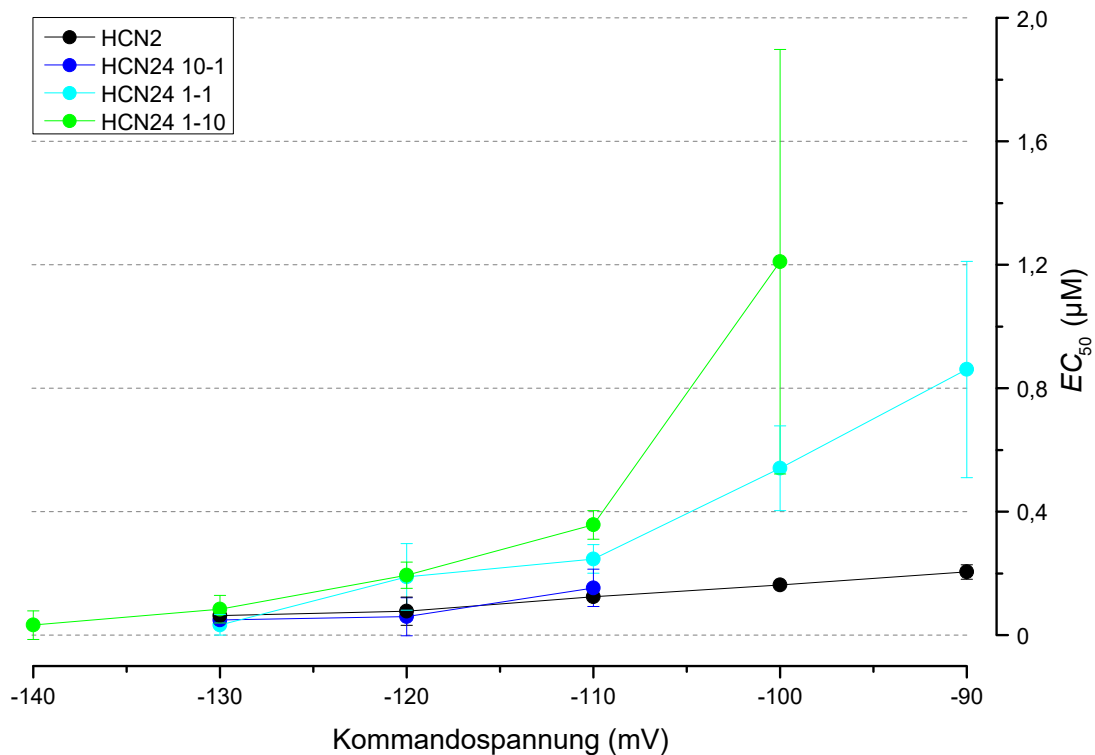


Bild 4.10: Änderung des EC_{50} -Wertes durch die Spannung

Dargestellt ist die cAMP-Konzentration der halbmaximalen Aktivierung EC_{50} in Abhängigkeit von der Spannung.

Der Hill-Koeffizient H bewegte sich unabhängig von der Spannung zwischen 0,7 und 1,9 (Tab. 4.2). Die Hill-Koeffizienten zwischen 1,0 und 1,9 für den HCN2-Kanal sprechen dafür, dass bei allen Spannungen mindestens zwei Untereinheiten am *Gating*-Mechanismus beteiligt sind. In allen heteromeren Kanälen waren die Hill-Koeffizienten niedriger. Sie variierten zwischen 0,7 und 1,1, was für eine reduzierte Kooperativität zwischen den Untereinheiten der heteromeren Kanäle im Vergleich zum HCN2-Kanal spricht.

Tab. 4.2: H aller Kanäle für unterschiedliche Spannungen (mV)

	-90	-100	-110	-120	-130	-140
HCN2	$1,8 \pm 0,3$	$1,9 \pm 0,1$	$1,6 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,7$	$1,3 \pm 0,3$	
HCN24 10:1		$0,6 \pm 0,6$	$1,1 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,6$	$1 \pm 0,2$	1 ± 2
HCN24 1:1	$1,2 \pm 0,6$	$0,9 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,3$	2 ± 1	$0,7 \pm 0,3$	
HCN24 1:10	$0,9 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,1$	$1 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,6$	1 ± 1

Die effektive Verschiebung von *Gating*-Ladungen über die Membran $z\delta$ zeigte keine Abhängigkeit von der Ligandenkonzentration. Ihre maximale Änderung betrug 1,4 für den HCN2-Kanal, 1,2 für den HCN24 1:10-Kanal, 1,1 für den HCN24 1:1-Kanal, 0,9 für den HCN24 10:1-Kanal und 1,1 für den HCN4-Kanal. Alle Kanäle zeigten die niedrigste und höchste Ladungsverschiebung über die Membran in unterschiedlichen Messkonfigurationen (Bild 4.11). Die Unterschiede zwischen der maximalen und minimalen Ladungsverschiebung waren für jeden Kanal signifikant. Für eine Übersicht sind die effektiven *Gating*-Ladungen in Tabelle 8.2 der Zusatzmaterialien (siehe Kapitel 8.1) zusammengestellt.

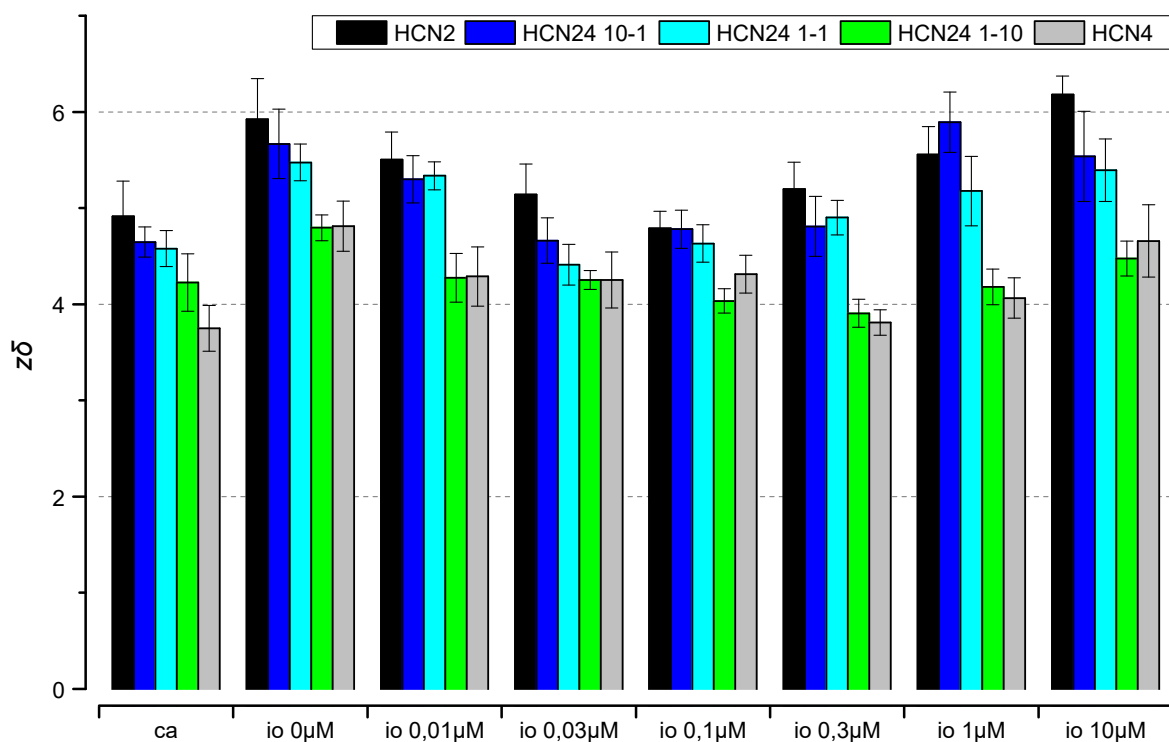


Bild 4.11: Effektive *Gating*-Ladung $z\delta$ aller Messkonfigurationen

Dargestellt ist die effektive *Gating*-Ladung $z\delta$, berechnet aus Messungen in der *Cell-Attached*-Konfiguration (ca) und der *Inside-out*-Konfiguration (io) mit verschiedenen cAMP-Konzentrationen in der Badlösung ($n = 7 - 16$).

4.2 Aktivierungskinetik

Neben dem Aktivierungsverhalten im Gleichgewicht wurde die Aktivierungskinetik nach hyperpolarisierenden Spannungssprüngen untersucht. Dazu wurde an die aufgezeichneten Stromspuren eine monoexponentielle Funktion (siehe Gleichung 3.3) angepasst und damit die Aktivierungszeitkonstante τ ermittelt. Die Aktivierungszeitkonstante τ gibt die Zeit an, in der 37 % der maximalen Stromamplitude der angepassten monoexponentiellen Funktion erreicht wurden. Damit ist τ ein Maß für die Geschwindigkeit der Kanalaktivierung.

Die Aktivierungszeitkonstante τ nahm bei allen getesteten HCN-Kanalvarianten durch hyperpolarisierende Spannungen und mit steigender cAMP-Konzentration zu. Bild 4.12 zeigt exemplarisch für den HCN2-Kanal den Einfluss der Messkonfiguration sowie den Einfluss verschiedener cAMP-Konzentrationen auf die Aktivierungsgeschwindigkeit. Bild 4.12A demonstriert dabei den Zusammenhang zwischen Aktivierungsgeschwindigkeit, ausgedrückt als Aktivierungszeitkonstante τ , und absoluter Spannung. Dabei wird deutlich, dass die Aktivierung mit zunehmender cAMP-Konzentration schneller abläuft. Die Geschwindigkeit der Aktivierung in der *Cell-attached*-Konfiguration war dabei von der Geschwindigkeit der Aktivierung bei 1 und 10 μM nicht zu unterscheiden, was durch die intrazelluläre cAMP-Konzentration der Oozyten von ca. 1 μM (Maller et al., 1979) erklärt werden kann.

Da in den unterschiedlichen Messbedingungen die absoluten Spannungen zu unterschiedlichen Aktivierungsniveaus (I/I_{max}) führten, wurden die Spannungen auf die halbmaximale Aktivierungsspannung $V_{0,5}$ der jeweiligen Messbedingung normiert (Bild 4.12B). Dadurch kann der Einfluss des Liganden cAMP auf die Aktivierungszeitkonstante eingeschätzt werden, ohne dass diese durch unterschiedliche spannungsinduzierte Aktivierung des Kanals verzerrt ist. Nach der Normierung gingen die Unterschiede in der Aktivierungskinetik zwischen den verschiedenen Messbedingungen verloren, was darauf hindeutet, dass das Aktivierungsniveau des Kanals unabhängig davon, durch welche Kombination aus Spannung und cAMP es erreicht wurde, die Aktivierungskinetik bestimmt und nicht die Spannung oder die cAMP-Konzentration allein. Das gleiche gilt für alle anderen Kanalvarianten (Bild 4.13).

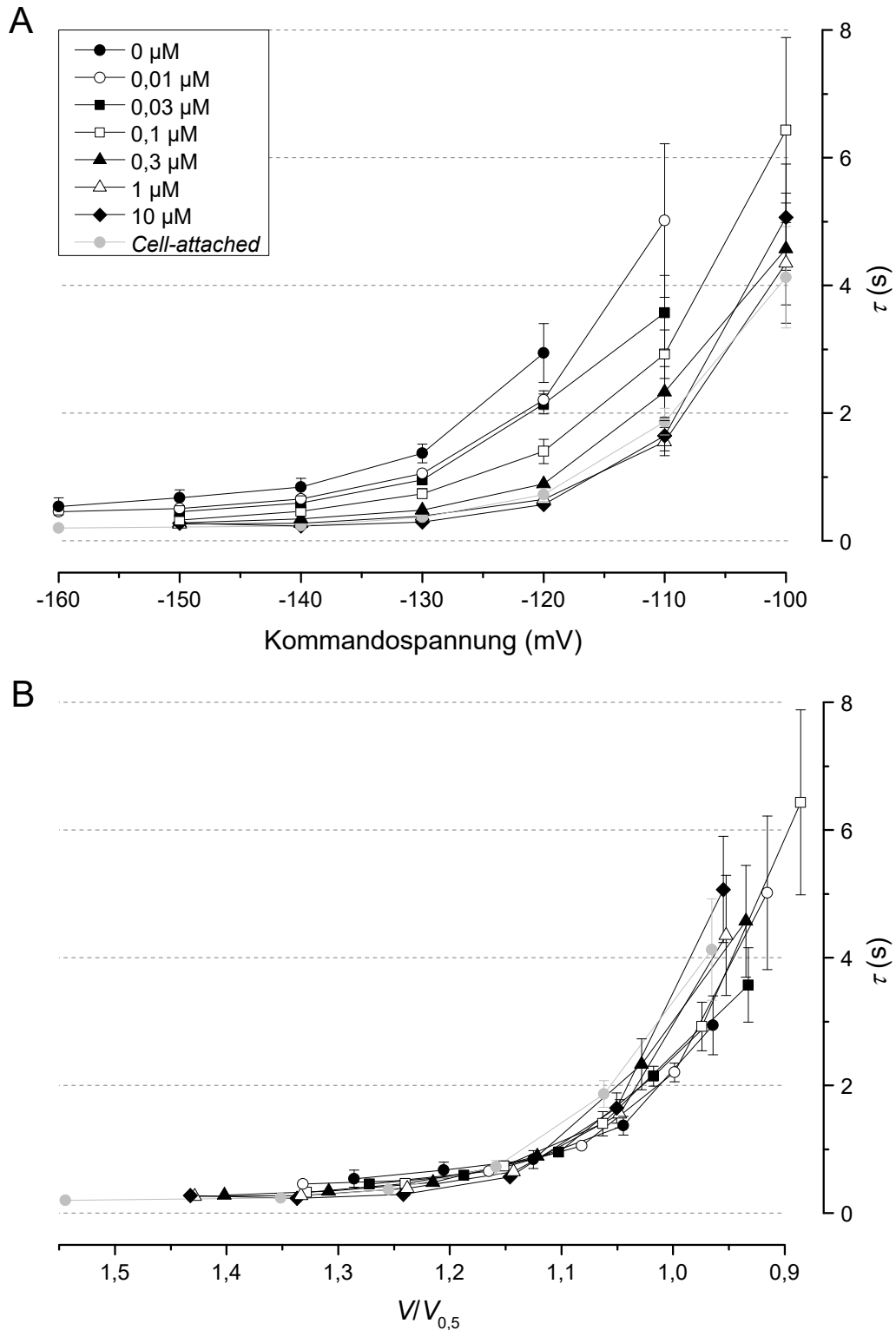


Bild 4.12: Abhängigkeit der Aktivierungszeitkonstante τ von der Spannung bzw. vom Aktivitätsniveau

Dargestellt sind die Aktivierungszeitkonstanten τ des HCN2-Kanals in Abhängigkeit von der Spannung und der Einfluss unterschiedlicher cAMP-Konzentrationen auf τ ($n = 3 - 14$). A) τ aufgetragen gegen die nicht-normierte Spannung. B) τ aufgetragen gegen die auf den $V_{0,5}$ -Wert der jeweiligen Messkonfiguration normierte Spannung. Durch die Normierung der Spannung schieben sich die τ der verschiedenen Messkonfigurationen übereinander, wodurch die Abhängigkeit vom Aktivierungsniveau sichtbar wird.

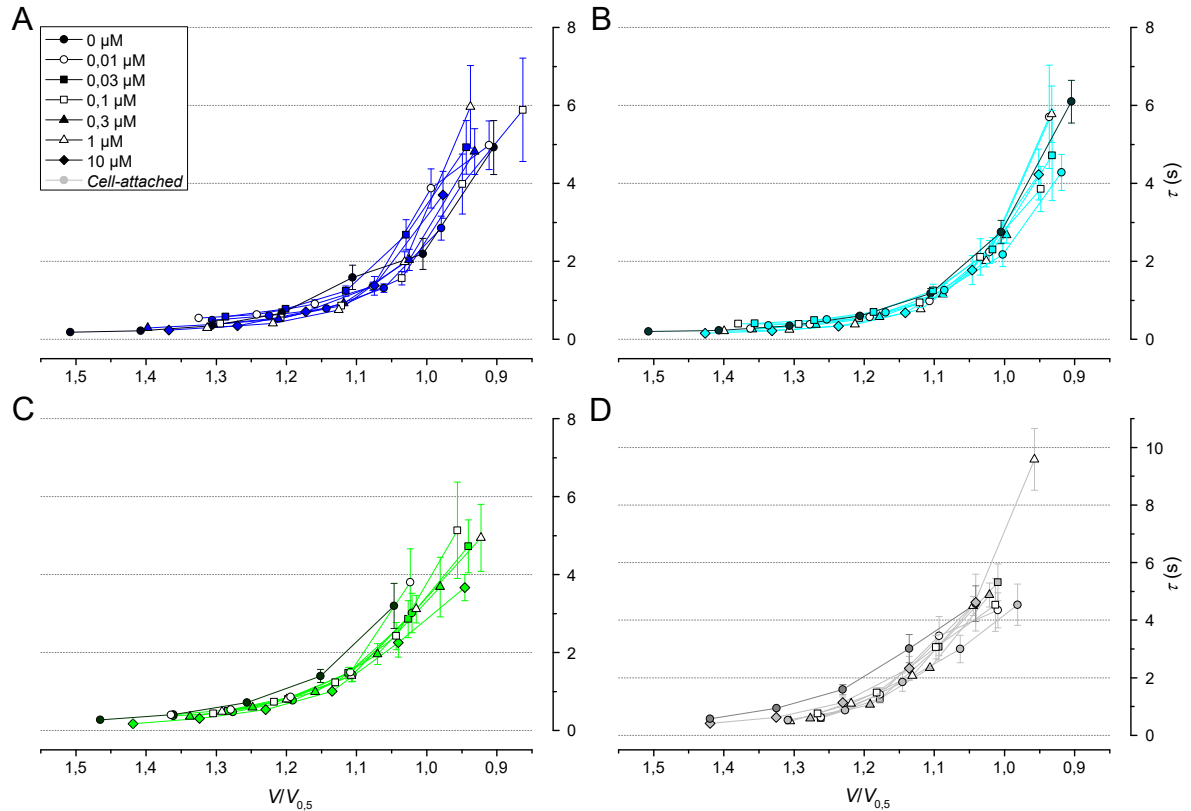


Bild 4.13: Aktivierungszeitkonstanten τ der heteromeren HCN24-Kanäle und des HCN4-Kanals

Dargestellt sind die Aktivierungszeitkonstanten τ in Abhängigkeit von der auf den $V_{0,5}$ -Wert der jeweiligen Messkonfiguration normierten Spannung und der Einfluss des Liganden cAMP ($n = 2 - 16$). τ für die Kanäle A) HCN24 10:1. B) HCN24 1:1 C) HCN24 1:10 D) HCN4.

Da festgestellt wurde, dass das Aktivierungsniveau und nicht die cAMP-Konzentration oder die Spannung allein die Aktivierungskinetik bestimmte, erfolgt der Vergleich der Kanalvarianten exemplarisch anhand der Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration mit 10 μM cAMP. Alle heteromeren Kanalvarianten aktivierten schneller als der HCN4-Kanal und dabei genauso schnell wie der HCN2-Kanal. Für Werte der normierten Spannung zwischen 1,23 und 1,27 betrug die Aktivierungszeitkonstante τ für den HCN2-Kanal $0,29 \pm 0,02$ s, für die heteromeren Kanäle HCN24 10:1, HCN24 1:1 und HCN24 1:10 $0,35 \pm 0,04$ s, $0,33 \pm 0,04$ s und $0,53 \pm 0,07$ sowie $1,13 \pm 0,2$ s für den HCN4-Kanal (Bild 4.14). Zur Übersicht sind sämtliche Aktivierungszeitkonstanten τ , sortiert nach Messkonfiguration, in den Tabellen 8.4 bis 8.11 der Zusatzmaterialien (siehe Kapitel 8.1) zusammengestellt.

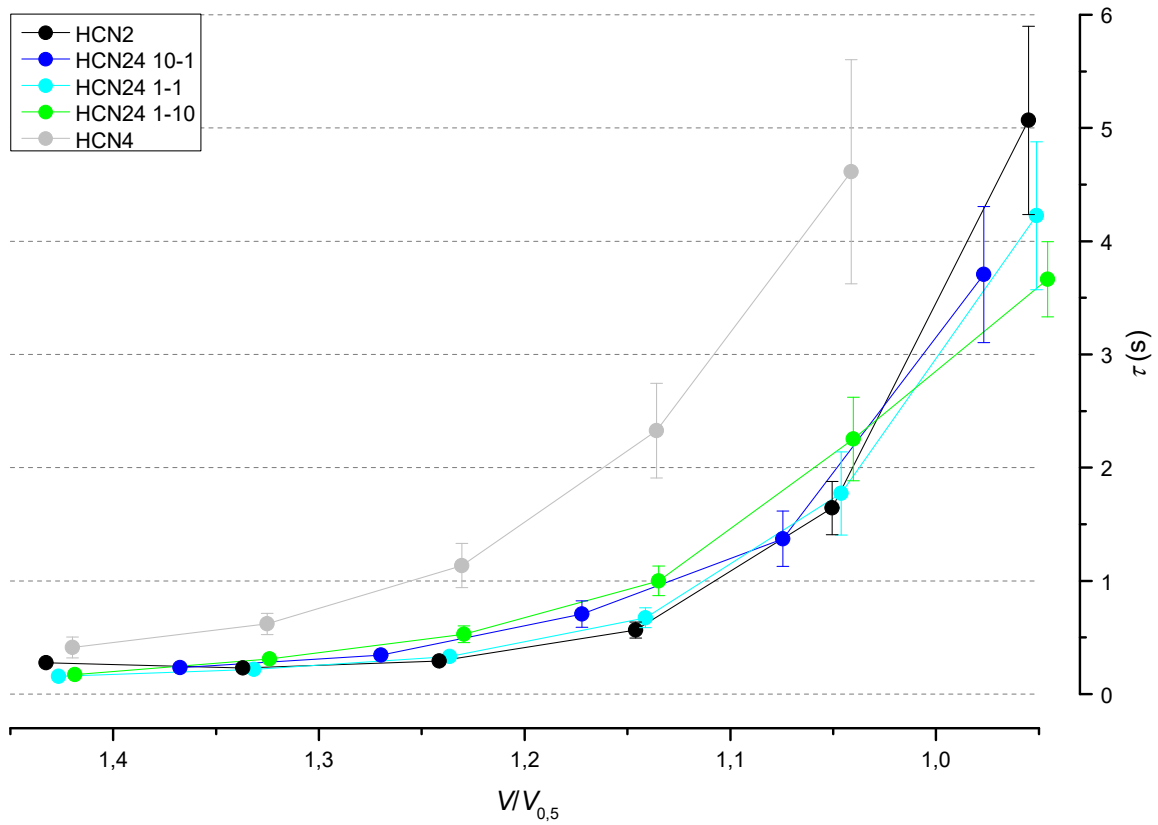


Bild 4.14: Aktivierungszeitkonstanten τ der *Inside-out*-Konfiguration mit 10 μM cAMP

Dargestellt sind die Aktivierungszeitkonstanten τ aller Kanalvarianten im Vergleich für eine Messkonfiguration ($n = 2 - 16$).

5 Diskussion

5.1 Expression heteromerer HCN24-Kanäle

Zur Untersuchung heteromerer HCN24-Kanäle wurden elektrophysiologische Untersuchungen an Oozyten des Krallenfrosches *Xenopus laevis* nach Koinjektion von HCN2- und HCN4-RNA durchgeführt. Die Kanäle generierten große Ströme in Oozyten-Patches (siehe Bild 4.1) (Chen et al., 2001b; Ulens und Tytgat, 2001; Zhang et al., 2009), dabei bestätigte sich, dass die HCN2-Untereinheiten der Maus mit den HCN4-Untereinheiten der Maus genauso zuverlässig zu heteromeren HCN24-Kanälen koassemblieren (Fischer, 2012) wie mit HCN4-Untereinheiten des Menschen (Zhang et al., 2009). Dies war zu erwarten, da die Sequenzübereinstimmung der Untereinheiten zwischen Mensch und Maus sehr groß ist. Für den HCN2-Kanal beträgt die DNA-Sequenzübereinstimmung zwischen Mensch und Maus 94 % (Ludwig et al., 1999) und die Sequenzübereinstimmung der Aminosäuren für den HCN4-Kanal zwischen den Spezies beträgt 98 % (Santoro et al., 1998).

Die Eigenschaften der Kanäle, die nach Koinjektion von HCN2- und HCN4-RNA der Maus entstehen, lassen sich nicht aus einer reinen Kombination der Eigenschaften homomerer HCN2- und HCN4-Kanäle erklären. Die halbmaximalen Aktivierungsspannungen $V_{0,5}$ der Kanäle nach Koinjektion waren bei Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration positiver als die von den homomeren HCN2- oder HCN4-Kanälen. Damit konnten frühere Ergebnisse, die mit der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode gewonnen wurden (Zhang et al., 2009; Fischer, 2012), bestätigt werden. Die einfachste Erklärung für diese neuen biophysikalischen Eigenschaften ist der Einbau heteromerer Kanäle in die Oozytenmembran.

In der vorliegenden Arbeit wurden die Eigenschaften der heteromeren HCN24-Kanäle in der *Inside-out*-Konfiguration noch detaillierter beschrieben. Es wurden neben der halbmaximalen Aktivierungsspannung $V_{0,5}$, die effektive *Gating*-Ladung $z\delta$ und die Aktivierungszeitkonstante τ der spannungsinduzierten Aktivierung der heteromeren HCN24-Kanäle ermittelt, sowie die Beeinflussung dieser Parameter durch verschiedene Ligandenkonzentrationen gemessen.

Um herauszufinden, ob die heteromeren HCN24-Kanäle mit einer bevorzugten Stöchiometrie gebildet werden, wurden die HCN2-RNA und die HCN4-RNA in verschiedenen Mischungsverhältnissen koinjiziert. Die RNAs wurden vor Injektion in den molekularen Verhältnissen 1:10, 1:1 und 10:1 gemischt.

Wie hoch ist die Wahrscheinlichkeit, dass bei einem Mischungsverhältnis von 1:10 oder 10:1 ausschließlich homomere Kanäle in die Oozytenmembran eingebaut wurden? Unter der Annahme, dass das Verhältnis der RNA in das gleiche Proteinverhältnis umgesetzt wird und sich die Untereinheiten HCN2 und HCN4 mit gleicher Wahrscheinlichkeit mit sich selbst und mit der jeweils anderen Isoform zu einem Kanal zusammenlagern (Whitaker et al., 2007), überwogen bei Injektion gleich vieler RNA-Moleküle HCN2 und HCN4 (Mischungsverhältnis 1:1) die heteromeren Kanäle (Bild 5.1A). Bei den Mischungsverhältnissen 1:10 und 10:1 wurden sehr wahrscheinlich wesentlich mehr homomere als heteromere HCN-Kanäle in die Membran eingebaut (Bild 5.1B).

Es wäre also zu erwarten, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften nach Injektion der Mischungsverhältnisse 10:1 und 1:10 von denen des homomeren HCN2- bzw. HCN4-Kanals bestimmt werden und sich damit von den Eigenschaften nach Injektion des Mischungsverhältnisses 1:1 unterscheiden. Entgegen dieser Vermutung konnten bei Messungen mit der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode keine Unterschiede in den Eigenschaften festgestellt werden (Zhang et al., 2009). Unabhängig vom injizierten Mischungsverhältnis ergaben die Messungen eine positivere halbmaximale Spannung als die der beiden homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 und ihre spannungsinduzierte Aktivierung war genauso schnell wie die des homomeren Kanals HCN2. Diese Ergebnisse wurden in der vorliegenden Arbeit durch Messungen in der *Cell-attached*-Konfiguration bestätigt.

Auch die Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration zeigten gleiche Eigenschaften für HCN24-Kanäle nach Koinjektion von RNA in den Mischungsverhältnissen 1:1 und 1:10. Nur für Kanäle nach Koinjektion im Mischungsverhältnis 10:1 zeigte sich nach dem Exzidieren eine Abweichung der Eigenschaften von den anderen Mischungsverhältnissen 1:1 und 1:10. Die Eigenschaften der Kanäle nach Koinjektion von HCN24 10:1 glichen sich denen des homomeren HCN2-Kanals an. Deshalb ist davon auszugehen, dass die Eigenschaften der Kanäle nach Koinjektion von HCN24 1:1 und HCN24 1:10 von heteromeren HCN24-Kanälen bestimmt sind und lediglich nach Koinjektion des Mischungsverhältnisses 10:1 stark überwiegend von homomeren HCN2-Kanälen.

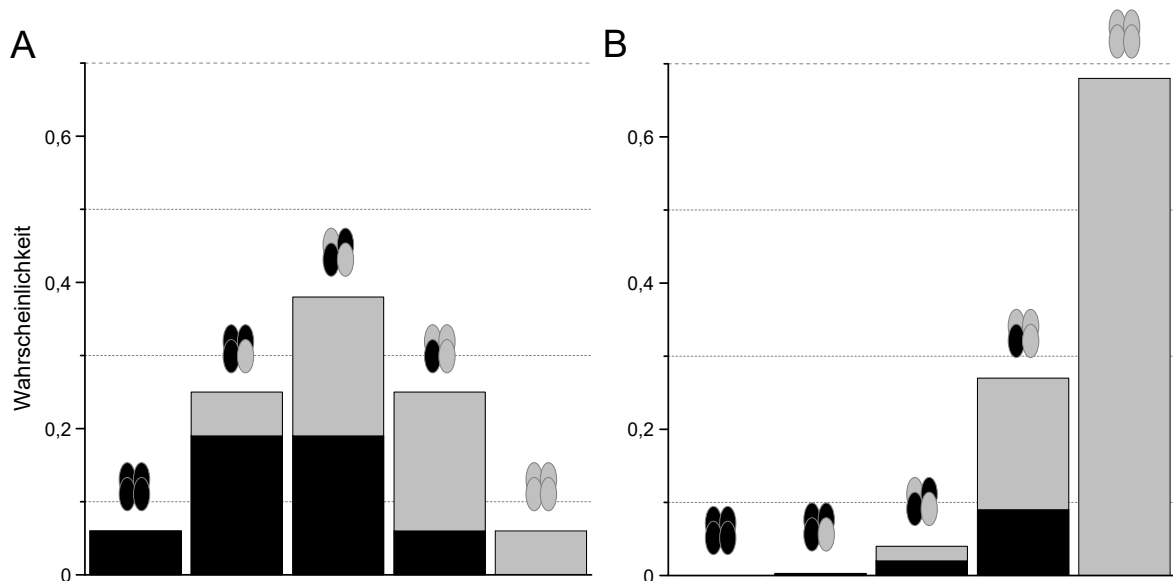


Bild 5.1: Theoretische Zusammensetzung der HCN-Untereinheiten im Patch

Dargestellt ist die Wahrscheinlichkeit der möglichen Kombinationen der HCN2- (schwarz) und HCN4-Untereinheiten (grau) in einem Kanalprotein unter Berücksichtigung des molekularen Mischungsverhältnisses der HCN2- und HCN4-RNA in der Injektionslösung (Whitaker et al., 2007). A) Das Histogramm zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Mischungsverhältnis 1:1. B) Das Histogramm zeigt die Wahrscheinlichkeit für das Mischungsverhältnis 1:10. Die Wahrscheinlichkeit für homomere HCN2-Kanäle beträgt 0,00007. Die theoretische Wahrscheinlichkeit für HCN24-Kanäle bestehend aus drei HCN2-Untereinheiten und einer HCN4-Untereinheit beträgt 0,0027. Für die Injektion der HCN2- und HCN4-RNA im Mischungsverhältnis 10:1 wird die Wahrscheinlichkeit der möglichen Kombinationen durch das Spiegelbild von B) dargestellt.

Wie sind die heteromeren HCN24-Kanäle aufgebaut? Um die gleichen elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle nach Koinjektion von HCN24 1:1 und HCN24 1:10 zu erklären, gibt es zwei Möglichkeiten: 1) eine bevorzugte Stöchiometrie bei der Zusammensetzung heteromerer HCN24-Kanäle oder 2) gleiche Eigenschaften aller heteromeren HCN24-Kanäle unabhängig von ihrer Stöchiometrie. Aufgrund der sehr hohen Präferenz für eine 2:1:1 Stöchiometrie der CNGA2-, CNGA4- und CNGB1b-Untereinheiten der verwandten olfaktorischen CNG-Kanäle (Zheng und Zagotta, 2004), die weitgehend unabhängig von der angebotenen RNA-Mischung umgesetzt wird, ist es denkbar, dass es auch bei heteromeren HCN-Kanälen eine bevorzugte Stöchiometrie gibt. Whitaker und Mitarbeiter (2007) konnten aber nachweisen, dass sich HCN2- und HCN4-Untereinheiten mit gleicher Präferenz mit sich selbst oder der anderen Untereinheit zu Kanaltetrameren zusammenlagern (Whitaker et al., 2007). Ulens und Tytgat (2001) haben die biophysikalischen Eigenschaften von Oozyten nach Injektion von HCN1-HCN2-Dimeren und nach Injektion von gleichen Mengen HCN1- und HCN2-RNA untersucht. Sie waren nicht voneinander zu unterscheiden (Ulens und Tytgat, 2001). Unter Berücksichtigung der

Arbeit von Whitaker und Mitarbeitern (2007) sprechen die Ergebnisse von Ulens und Tytgat (2001) für die zweite der oben aufgeführten Möglichkeiten, die elektrophysiologischen Eigenschaften der heteromeren HCN24-Kanäle zu erklären. Das würde bedeuten, dass heteromere HCN-Kanäle mit unterschiedlicher Stöchiometrie, aber gleichen Eigenschaften in die Oozytenmembran eingebaut wurden.

Da nach der Koinjektion von HCN2- und HCN4-RNA neben dem Einbau heteromerer Kanäle mit hoher Wahrscheinlichkeit vom Einbau homomerer HCN-Kanäle in die Membran der Oozyten ausgegangen werden kann (Bild 5.1), sollte trotz der Ergebnisse von Ulens und Tytgat die Möglichkeit in Betracht gezogen werden, dass sich die Eigenschaften der heteromeren Kanäle noch stärker als gezeigt von denen der homomeren Kanäle unterscheiden.

Die Eigenschaften von heteromeren HCN24-Kanälen werden wahrscheinlich am besten bei Koinjektion von HCN24 1:10 beschrieben. Bei der Koinjektion in diesem Mischverhältnis müssten zwar überwiegend homomere HCN4-Kanäle in die Membran eingebaut worden sein (Bild 5.1), aber die Eigenschaften der unter diesen Bedingungen vermessenen Kanäle unterschieden sich deutlich von denen homomerer HCN4-Kanäle. Die $V_{0,5}$ -Werte nach Koinjektion von HCN24 1:10 waren in der *Cell-attached*-Konfiguration und in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP am weitesten von denen der beiden homomeren HCN-Kanäle entfernt – ganz im Gegensatz zu den $V_{0,5}$ -Werten nach Koinjektion von HCN24 10:1. Die Eigenschaften dieser *Patches* waren wahrscheinlich von denen homomerer HCN2-Kanäle dominiert, sodass sich ihre Eigenschaften kaum unterschieden. Kanäle nach Koinjektion von HCN24 1:10 unterschieden sich nicht nur in der spannungsinduzierten Aktivierung im Gleichgewicht von HCN4-Kanälen, sondern auch in der Modulation durch cAMP und der spannungsinduzierten Aktivierungskinetik. Die Aktivierungskurve von Kanälen nach Koinjektion von HCN24 1:10 wurde von cAMP schon in zehnfach geringerer Konzentration zu positiveren Spannungen verschoben als die Gleichgewichts-Aktivierung von HCN4-Kanälen. Zudem aktivierten Kanäle nach Koinjektion von HCN24 1:10 wesentlich schneller als HCN4-Kanäle. Damit aktivierten sie genauso schnell wie die Kanäle HCN2, HCN24 10:1 und HCN24 1:1.

Die wesentlich geringeren Stromamplituden der *Patches* mit homomeren HCN4-Kanälen und nach Koinjektion von HCN24 1:10 (siehe Bild 4.2) lassen als eine Erklärung zu, dass HCN4-Kanäle bei gleicher RNA-Menge in geringerer Zahl in die Oozytenmembran eingebaut wurden. Diese Vermutung konnte mit immunzytologischen Techniken widerlegt

werden (Kusch et al., 2013). Mit fluorophorgekoppelten Antikörpern markierte HCN4-Untereinheiten erzeugten Fluoreszenzintensitäten, die nicht signifikant geringer waren als die nach immunzytologischer Markierung von HCN2-Untereinheiten. Auch nach Koexpression von HCN2- und HCN4-Untereinheiten im Verhältnis 1:1 und anschließender Markierung der HCN4-Untereinheiten änderte sich die Fluoreszenzintensität nicht signifikant. Die Stromamplitude nahm aber zu. Das heißt, dass homomere HCN4-Kanäle genauso gut in die Oozytenmembran eingebaut wurden wie homomere HCN2-Kanäle. Sie besitzen aber wahrscheinlich eine geringere Offenwahrscheinlichkeit, was zu geringen Stromamplituden bei alleiniger HCN4-Expression führt und eventuell den geringen Einfluss der homomeren HCN4-Kanäle auf die elektrophysiologischen Eigenschaften nach Koexpression von HCN2- und HCN4-Untereinheiten im Verhältnis 1:10 erklärt. Dies könnte mit Einzelkanaluntersuchungen geklärt werden (Thon et al., 2013).

5.2 Spannungsinduziertes Schaltverhalten und dessen cAMP-Abhängigkeit

Im Folgenden soll das spannungsinduzierte Schaltverhalten heteromerer und homomerer Kanäle diskutiert werden.

Zunächst wurden die Kanäle in der *Cell-attached*-Konfiguration untersucht. Der *Patch* wurde also nicht aus der Membran herausgerissen, sodass die Kanäle während der Messung mit dem intrazellulären Milieu der Oozyte in Kontakt standen. In dieser Messkonfiguration wiesen heteromere HCN24-Kanäle positivere $V_{0,5}$ -Werte auf als die beiden homomeren HCN-Kanäle (siehe Bild 4.4). Wie bereits erwähnt, konnten damit Ergebnisse, die mit der Zwei-Mikroelektroden-*Voltage-Clamp*-Methode gewonnen wurden (Zhang et al., 2009; Fischer, 2012), bestätigt werden. Bei dieser Methode bleibt ebenso wie bei der *Cell-attached*-Konfiguration die Oozyte intakt. In der *Cell-attached*-Konfiguration war der $V_{0,5}$ -Wert des HCN2-Kanals signifikant verschieden zu denen der Kanäle HCN24 1:10, HCN4 und HCN24 1:1, nicht aber zu dem des HCN24 10:1-Kanals. Zusätzlich unterschied sich der $V_{0,5}$ -Wert des HCN4-Kanals signifikant von dem des HCN24 1:10-Kanals, nicht aber von denen der HCN24 10:1- und HCN24 1:1-Kanäle.

Die Kanäle sind in der *Cell-attached*-Konfiguration sehr wahrscheinlich durch cAMP moduliert, da die Oozyte endogen ca. 1 μM cAMP enthält (Maller et al., 1979). Um das

spannungsinduzierte Schaltverhalten der heteromeren HCN24-Kanäle ohne Modulation durch den Liganden zu untersuchen, wurden daher Messungen in der *Inside-out*-Konfiguration durchgeführt. Dabei wurde der *Patch* aus der Oozytenmembran exzidiert, sodass die intrazelluläre Seite der HCN-Kanäle von der Badlösung umspült wurde. Die $V_{0,5}$ -Werte der heteromeren HCN24-Kanäle blieben auch ohne das Zytosol der Oocyte positiver als die $V_{0,5}$ -Werte der homomeren Kanäle HCN2 und HCN4.

Die Aktivierung heteromerer Kanäle in Abwesenheit eines Liganden war im Vergleich zu den homomeren Kanälen schon durch positivere Spannungen möglich. Diese Eigenschaft deutet auf eine geringere Autoinhibition der heteromeren Kanäle hin. Die Autoinhibition homomerer HCN-Kanäle hängt von der HCN-Isoform ab (Wainger et al., 2001). Das basale *Gating*, ohne Einfluss von cAMP, wird von der transmembranären Region, dem C-Linker und der CNBD bestimmt (Wang et al., 2001). Wird eine dieser drei Kanalstrukturen durch die einer anderen Isoform ersetzt, verändert sich der $V_{0,5}$ -Wert in Abwesenheit von cAMP. Die Kristallstruktur der C-terminalen Region ist allerdings für alle Isoformen sehr ähnlich (zusammengefasst in Schünke und Stoldt, 2013). Warum der C-Linker und die CNBD trotz sehr ähnlicher Kristallstruktur beim Tausch zwischen HCN-Isoformen das basale *Gating* verändern, ist noch nicht geklärt. Bekannt ist, dass für die Ausübung der Autoinhibition und ihre Modulation durch cAMP eine Zusammenlagerung der C-Linker zu einem *Gating*-Ring notwendig ist (Ulens und Siegelbaum, 2003) und dass diese Zusammenlagerung über einen sogenannten „Ellenbogen-Schulter-Mechanismus“ stattfindet (Zagotta et al., 2003; Lolicato et al., 2011; Akimoto et al., 2014). Die durch Ligandenbindung hervorgerufenen Konformationsänderungen der CNBD und der an die CNBD angrenzenden F'-Helix des C-Linkers werden über den *Gating*-Ring auf die Kanalpore übertragen, was zu einer Verminderung der Autoinhibition führt und damit die Öffnung des Kanals begünstigt (Taraska et al., 2009; Puljung et al., 2014). Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen nahe, dass die homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 eine sehr ähnliche Autoinhibition aufweisen. Aus diesem Grund war nicht zu erwarten, dass die heteromeren HCN24-Kanäle eine abweichende Autoinhibition besitzen. Eine verminderte Autoinhibition der heteromeren HCN24-Kanäle könnte über die Interaktion von Kanalstrukturen der verschiedenen Isoformen durch die Heteromerisierung erklärt werden. Diese Interaktionen könnten zum Beispiel zwischen dem C-Linker einer HCN2-Untereinheit und dem S4-S5-Linker einer HCN4-Untereinheit stattfinden oder zwischen den C-Linkern der beiden Isoformen.

Ein Vergleich der $V_{0,5}$ -Werte der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP mit den $V_{0,5}$ -Werten der *Cell-attached*-Konfiguration zeigt, dass die $V_{0,5}$ -Werte aller gemessenen HCN-Kanäle in der *Inside-out*-Konfiguration negativer waren. Der Verlust zytosolischer und eventuell auch membranständiger Bestandteile der Oozyte führte zu einer Verschiebung der Aktivierungskurven um 17 - 23 mV zu negativeren Spannungen. Die Aktivierungskurven des HCN2-Kanals und der heteromeren HCN24-Kanäle wurden etwa gleich stark durch das Exzidieren verschoben, die des HCN4-Kanals etwas weniger stark. Sollte die Verschiebung der Aktivierungskurven allein durch den Verlust intrazellulären cAMPs verursacht worden sein, wäre zu erwarten, dass durch das Anspülen einer Badlösung mit sättigender cAMP-Konzentration die elektrophysiologischen Eigenschaften der *Cell-attached*-Konfiguration wiederhergestellt werden können. Für die homomeren HCN2- und HCN4-Kanäle trifft die Vermutung tatsächlich zu. Sie erreichten unter diesen Messbedingungen die $V_{0,5}$ -Werte, die in der *Cell-attached*-Konfiguration gemessen wurden. Für die heteromeren HCN24-Kanäle dagegen war eine Wiederherstellung der elektrophysiologischen Eigenschaften in der *Cell-attached*-Konfiguration nicht möglich. Ihre $V_{0,5}$ -Werte blieben auch mit einer sättigenden cAMP-Konzentration von 10 μ M in der Badlösung negativer als unter Einfluss des Oozytenzytosols. Für die HCN24-Kanäle bei einem Mischungsverhältnis von 1:1 und 1:10 waren die Unterschiede zwischen den $V_{0,5}$ -Werten der beiden Messkonfigurationen signifikant, für den HCN24 10:1-Kanal allerdings nicht. Hier bietet sich wieder als Erklärung an, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften nach Injektion von HCN2- und HCN4-RNA im Verhältnis 10:1 wahrscheinlich stark von homomeren HCN2-Kanälen bestimmt wurden. Der $V_{0,5}$ -Wert des HCN24 1:10-Kanals blieb in der *Inside-out*-Konfiguration gemessen mit sättigender cAMP-Konzentration weiter von dem der *Cell-attached*-Konfiguration entfernt als der $V_{0,5}$ -Wert des HCN24 1:1-Kanals. Dieser Unterschied wäre gut durch den unterschiedlich starken Einfluss homomerer HCN2-Kanäle zu erklären. Nach Koinjektion von HCN24 1:1 sollten ca. 6 % aller entstehenden Kanäle homomere HCN2-Kanäle sein, nach Koinjektion von HCN24 1:10 nur ca. 0,007 % (siehe Bild 5.1).

Wie ist zu erklären, dass sich mit sättigender cAMP-Lösung die $V_{0,5}$ -Werte der *Cell-attached*-Konfiguration bei den homomeren HCN2- und HCN4-Kanälen wiederherstellen ließen und bei den heteromeren HCN24-Kanälen nicht? Es handelt sich offensichtlich um eine neue Eigenschaft der heteromeren HCN24-Kanäle. Der Unterschied lässt sich weder durch den Einfluss homomerer HCN2-Kanäle noch durch den Einfluss homomerer HCN4-Kanäle erklären, da die spannungsinduzierte Aktivierung im Gleichgewicht bei beiden

homomeren Kanälen gleich stark durch cAMP beeinflusst wurde. Für die heteromeren HCN24-Kanäle reichte cAMP allein nicht aus, um die elektrophysiologischen Eigenschaften an der intakten Oozyte wiederherzustellen. Es blieb eine Differenz von 10 mV. Die spannungsabhängige Aktivierung der heteromeren HCN24-Kanäle wurde in der Oozytenmembran also stärker durch andere Einflüsse als die cAMP-Bindung zu positiveren Spannungen verschoben. Dabei handelt es sich möglicherweise um abspülbare zytosolische bzw. membranständige Faktoren. Bemerkenswert ist, dass diese Faktoren selektiv die heteromeren HCN-Kanäle beeinflussen. Dabei könnte es sich um PIP₂ (Pian et al., 2006; Zolles et al., 2006) oder Proteinkinasen (Santoro et al., 1997; Zong et al., 2005) handeln.

Nachdem ersichtlich war, dass cAMP heteromere und homomere HCN-Kanäle unterschiedlich moduliert, wurde die Wirkung von cAMP auf die untersuchten Kanalvarianten genauer betrachtet. Um die Verschiebung der Aktivierungskurven durch cAMP isoliert von anderen Modulatoren im Detail zu untersuchen, wurde das Kanalverhalten in der *Inside-out*-Konfiguration in Anwesenheit verschiedener cAMP-Konzentrationen sowie in Abwesenheit von cAMP studiert. Der größte Effekt durch cAMP zeigte sich beim Vergleich der $V_{0,5}$ -Werte ohne cAMP und mit sättigender cAMP-Konzentration. Unter dem Einfluss einer sättigenden cAMP-Konzentration glichen sich die $V_{0,5}$ -Werte der heteromeren und homomeren Kanäle an und erreichten eine gemeinsame Grenze. Weil die heteromeren HCN24-Kanäle in der *Inside-out*-Konfiguration ohne Ligand schon bei positiveren Spannungen aktivierten, war die Verschiebung ihrer Aktivierungskurven durch cAMP zu dieser gemeinsamen Grenze kleiner als die Verschiebung der Aktivierungskurven der homomeren Kanäle (siehe Bild 4.8 und Tab. 4.1). Der $V_{0,5}$ -Wert der Kanäle nach Koinjektion von HCN24 10:1 in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP wurde durch cAMP genauso stark verschoben wie der $V_{0,5}$ -Wert der Kanäle nach Injektion von HCN2-RNA allein, was sich gut mit dem Überwiegen von homomeren HCN2-Kanälen in diesen *Patches* erklären lässt (siehe Bild 5.1). Die $V_{0,5}$ -Werte nach Koinjektion von HCN24 1:1 und HCN24 1:10 wurden deutlich weniger stark von cAMP beeinflusst. Durch den Einbau homomerer HCN4-Kanäle in die Oozytenmembran lässt sich diese verminderte cAMP-Modulation der Aktivierungskurve heteromerer HCN24-Kanäle nicht erklären, da die maximale Verschiebung der Aktivierungskurve homomerer HCN4-Kanäle größer war als die maximale Verschiebung der Aktivierungskurve nach Koinjektion von HCN24 1:1 und HCN24 1:10. Würden die Eigenschaften homomerer HCN4-Kanäle diese *Patches* dominieren, wären sie stärker durch cAMP verschoben worden. Auch legt die viermal so hohe Ligandenkonzentration

tration für den halbmaximalen Effekt (siehe Tab. 4.1) nahe, dass die elektrophysiologischen Eigenschaften der Kanäle nach Koinjektion von HCN24 1:10 nicht von homomeren HCN4-Kanälen bestimmt wurden. Damit ist die verminderte Verschiebung der Aktivierungskurve durch cAMP eine den heteromeren HCN24-Kanälen eigene Eigenschaft. Sie wird vermutlich durch eine geringere Autoinhibition der heteromeren HCN24-Kanäle verursacht.

5.3 Modulation der scheinbaren Affinität durch die Spannung

Beide aktivierende Stimuli der HCN-Kanäle, Spannung und Ligandenbindung, stehen in einem reziproken Verhältnis zueinander: Während die Ligandenbindung das spannungsinduzierte Schaltverhalten beeinflusst, beeinflusst umgekehrt auch die spannungsinduzierte Aktivierung die Ligandenbindung und damit den ligandeninduzierten Effekt (Kusch et al., 2010). Um den Effekt der Spannung auf die Wirkung des Liganden cAMP darzustellen, können die durch eine bestimmte Spannung induzierten Ströme gegen die Ligandenkonzentration aufgetragen werden (siehe Bild 4.9). Diese Konzentrations-Wirkungs-Kurven wurden für unterschiedliche Spannungen erstellt. Es gelang für alle Kanalvarianten außer den HCN4-Kanal diesen Zusammenhang zu studieren, da die *Patches* mit homomeren HCN4-Kanälen nicht ausreichend stabil waren. Die für den halbmaximalen Strom benötigte Ligandenkonzentration EC_{50} nahm bei allen Kanälen mit stärker hyperpolarisierender Spannung ab. Bei nahezu maximaler spannungsinduzierter Aktivierung von -130 mV unterschieden sich die EC_{50} -Werte des HCN2-Kanals und der heteromeren Kanäle nicht. Anders verhielt sich die scheinbare Affinität bei Spannungen von -90 und -100 mV, die nahe der Aktivierungsschwelle der HCN-Kanäle liegen. In diesem Bereich zeigten sich deutliche Unterschiede zwischen den Kanalvarianten. Mit steigendem Anteil injizierter HCN4-RNA nahm der EC_{50} -Wert bei Anliegen der gleichen Spannung zu (siehe Bild 4.10), was heißt, dass die heteromeren Kanäle bei schwacher spannungsinduzierter Aktivierung eine geringere scheinbare Affinität zu cAMP zeigten als die homomere HCN2-Kanäle. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass das spannungsinduzierte Schaltverhalten homomerer HCN2-Kanäle bereits bei geringerer cAMP-Konzentration durch die Ligandenbindung beeinflusst wurde als das der heteromeren HCN24-Kanäle.

Daraus kann allerdings keine direkte Aussage über die Bindungsaffinität heteromerer HCN24-Kanäle für cAMP abgeleitet werden. Zusätzlich zu den *Patch-Clamp*-Experimenten für die vorliegende Arbeit wurde die ligandeninduzierte Aktivierung heteromerer HCN24-Kanäle von Fischer (2012) untersucht. Durch die Untersuchung der Deaktivierung nach Ligandenentzug konnten Rückschlüsse auf die Bindungsaffinität heteromerer HCN24-Kanäle zu cAMP gezogen werden (Fischer, 2012). Homomere HCN2- und HCN4-Kanäle sowie heteromere HCN24-Kanäle deaktivierten nicht nach Ligandenentzug bei einer Spannung von -130 mV. Nach Ligandenentzug bei einer Spannung von -90 mV deaktivierten sie gleichstark. Für den HCN4-Kanal konnte aufgrund einer fehlenden ligandeninduzierten Aktivierung bei -90 mV keine ligandeninduzierte Deaktivierung bestimmt werden. Das ähnliche ligandeninduzierte Dissoziationsverhalten weist auf eine identische Bindungsaffinität homomerer HCN2- und heteromerer HCN24-Kanäle für cAMP hin (Fischer, 2012). Da bei Spannungen nahe der Aktivierungsschwelle für die heteromeren HCN24- und homomeren HCN2-Kanäle unterschiedliche EC_{50} -Werte ermittelt wurden, die Bindungsaffinität zu cAMP aber identisch ist, ist die Ursache für diesen Unterschied in den Konformationsänderungen zu suchen, die durch die cAMP-Bindung ausgelöst werden. Um eine exakte Bindungsaffinität der heteromeren HCN24-Kanäle für cAMP zu bestimmen, müsste die Bindung von cAMP direkt gemessen werden, zum Beispiel mit konfokaler *Patch-Clamp*-Fluorometrie unter Verwendung fluoreszierender Liganden (Biskup et al., 2007).

5.4 Aktivierungskinetik

Durch Membranspannung und Ligandenbindung wird nicht nur die Amplitude des HCN-Stroms bestimmt, sondern auch die Geschwindigkeit der Aktivierung. Um diese zu quantifizieren, wurde an die spannungsinduzierten Ströme aller HCN-Kanäle eine monoexponentielle Funktion angepasst und damit eine Aktivierungszeitkonstante τ ermittelt (siehe Gleichung 3.3). Alle Kanalvarianten aktivierten bei hyperpolarisierenden Spannungen und in Anwesenheit von cAMP schneller. Unter allen Messbedingungen aktivierten die Heteromere schneller als der HCN4-Kanal und genauso schnell wie der HCN2-Kanal. Damit konnten die Ergebnisse, die Zhang und Mitarbeiter (2009) mit Messungen in der *Whole-Cell*-Konfiguration an HEK-Zellen gewonnen haben, bestätigt werden (Zhang et al., 2009).

Diese Ergebnisse legen die Vermutung nahe, dass die spannungsinduzierte Aktivierungsgeschwindigkeit heteromerer HCN-Kanäle durch die Geschwindigkeit der Konformationsänderungen der schnelleren Isoform bestimmt ist. Dies würde bedeuten, dass im heteromeren HCN24-Kanal die Bewegung des Spannungssensors (S4) der HCN2-Untereinheiten allein einen maximalen Effekt auf die Kanalpore ausübt. Da in den HCN2-Untereinheiten der Effekt der S4-Bewegung schneller auf die Kanalpore übertragen wird als in den HCN4-Untereinheiten, würden die HCN2-Untereinheiten die Aktivierungskinetik für den gesamten heteromeren Kanal bestimmen. In der Tat konnte gezeigt werden, dass die Bewegung von zwei Spannungssensoren (S4) genügt, um den HCN-Kanal vollständig zu aktivieren (Bruening-Wright et al., 2007). Ebenso ist über die ligandeninduzierte Aktivierung bekannt, dass die Bindung von cAMP an zwei Untereinheiten eines HCN-Kanals genügt, um diesen maximal zu aktivieren. Die Bindung eines cAMP-Moleküls an die dritte und vierte Untereinheit aktiviert den Kanal nicht stärker (Kusch et al., 2010). Damit könnte angenommen werden, dass die heteromeren HCN24-Kanäle eine spannungsinduzierte Aktivierungskinetik wie der homomere HCN2-Kanal zeigen, weil die Aktivierung der HCN2-Untereinheiten allein bereits einen maximalen Effekt auf die Kanalpore ausübt.

Im Gegensatz dazu konnte in einer parallel durchgeführten Studie gezeigt werden, dass die Heteromerisierung die ligandeninduzierte Aktivierung der HCN-Kanäle anders beeinflusst als die spannungsinduzierte Aktivierung. Die ligandeninduzierte Aktivierung heteromerer HCN24-Kanäle war schneller als die der beiden homomeren Kanäle HCN2 und HCN4 (Fischer, 2012). Die Veränderung der ligandeninduzierten Aktivierungskinetik durch die Heteromerisierung ist plausibel, da der Effekt der Ligandenbindung auf die Kanalpore über Konformationsänderungen der CNBD und des C-Linkers vermittelt wird und der C-Linker dabei mit Strukturen der benachbarten Untereinheit interagiert (Ulens und Siegelbaum, 2003; Craven et al., 2008). Durch die Heteromerisierung findet diese Interaktion zwischen Strukturen verschiedener Isoformen statt. Das könnte die Geschwindigkeit der Übertragung des Effektes der Ligandenbindung auf die Kanalpore verändern.

Zusätzlich hat sich abgezeichnet, dass für alle untersuchten Kanalvarianten gleiche Aktivierungsgeschwindigkeiten auf gleichem Aktivitätsniveau (I/I_{\max}) erreicht wurden, unabhängig davon durch welche Kombination aus Spannung und cAMP dieses Niveau erreicht wurde. Die Geschwindigkeit der Kanalaktivierung hängt also nicht allein von der absoluten Spannung oder allein von der cAMP-Konzentration ab, sondern vom Grad der

generellen Aktivierung. Dieses Aktivitätsniveau kann bei verschiedenen Ligandenkonzentrationen durch unterschiedliche Spannungen erreicht werden. Die Bindung von cAMP beschleunigt also nicht direkt die Öffnung der HCN-Kanäle, sondern verschiebt die Aktivierungskurve zu positiveren Spannungen. Daher wird durch die gleiche Spannung eine stärkere Kanalaktivierung erreicht, die mit einer schnelleren Öffnung einhergeht. Deshalb werden die Abhängigkeiten der Aktivierungskinetik am besten mit auf den $V_{0,5}$ -Wert normierten Spannungen dargestellt (siehe Bild 4.12). Dies ermöglicht zudem die vergleichende Darstellung der Aktivierungskinetik von HCN-Kanälen mit unterschiedlichen $V_{0,5}$ -Werten unter sonst gleichen Messbedingungen.

5.5 Ausblick

Vor fast 40 Jahren wurde der ungewöhnliche hyperpolarisationsaktivierte Strom I_h entdeckt. Vor mehr als 15 Jahren konnte seine molekulare Grundlage aufgeklärt werden, indem der HCN-Kanal mit vier unterschiedlichen Isoformen in Säugetieren kloniert wurde. Sein Vorkommen und seine Verteilung in unterschiedlichen Spezies und Geweben sowie die elektrophysiologischen Eigenschaften in diesen wurden untersucht. Es bleibt die Frage, in welcher Stöchiometrie native HCN-Kanäle zusammengesetzt sind und ob Stöchiometrie-Unterschiede für die gewebespezifischen Eigenschaften von I_h verantwortlich sind.

Um dieser Frage auf den Grund zu gehen, ist es notwendig, die Ströme verschieden zusammengesetzter Kanäle mit den gewebespezifischen I_h zu vergleichen. Die Grundlage für diesen Vergleich ist die Untersuchung der elektrophysiologischen Eigenschaften an einem möglichst einfachen Modell mit möglichst wenig beeinflussenden Faktoren, wie sie zum Beispiel im Zytosol enthalten sind. Dazu bietet sich die Untersuchung der HCN-Kanäle am exzidierten *Patch* an. Damit ist es möglich, die Wirkung einzelner Faktoren auf das Aktivierungsverhalten des Kanals isoliert zu untersuchen. Der Vergleich homomerer HCN-Kanäle mit nativen I_h von Sinusknotenzellen und Neuronen zeigte wenig Übereinstimmung. Die Untersuchung elektrophysiologischer Eigenschaften heteromerer HCN-Kanäle steht noch am Anfang. Bestimmte Zusammensetzungen wurden bereits charakterisiert (siehe Kapitel 1.5).

Durch die im Rahmen dieses Projektes angestellten Untersuchungen konnten Einsichten in das spannungsinduzierte Verhalten heteromerer HCN24-Kanäle und deren Modulation durch cAMP gewonnen werden. Sie können Grundlage für einen Vergleich mit nativen I_h sein.

Eine Einschränkung der Untersuchung elektrophysiologischer Eigenschaften heteromerer HCN-Kanäle durch Koexpression verschiedener Isoformen besteht im nicht vermeidbaren gleichzeitigen Einbau homomerer HCN-Kanäle, wenn auch in geringem Anteil. Um *Patches* allein mit heteromeren HCN-Kanälen zu erhalten, könnten heteromere Konkatomere exprimiert werden. Dies würde Untersuchungen zur Auswirkung der Anzahl und Anordnung der Untereinheiten auf die elektrophysiologischen Eigenschaften erlauben. Für Heteromere aus HCN1- und HCN2-Untereinheiten konnte gezeigt werden, dass nach der Expression von HCN1-HCN2-Dimeren Ströme mit nahezu gleichen Eigenschaften gemessen werden können wie nach Koexpression von HCN1- und HCN2-Untereinheiten im Verhältnis 1:1 (Ulens und Tytgat, 2001). Es ist zu vermuten, dass dies auch für andere HCN-Isoformen gilt. Der Beweis durch vergleichende Experimente steht noch aus. Würde der Beweis gelingen, könnte man auf die leichter umsetzbare Methode der Koexpression zurückgreifen, um elektrophysiologische Eigenschaften heteromerer HCN-Kanäle detaillierter zu untersuchen. Des Weiteren wäre durch die Expression heteromerer Konkatomere die Untersuchung der Einzelkanalströme heteromerer HCN-Kanäle möglich. Die Ergebnisse nach Koinjektion wären nicht eindeutig, da die Einzelkanaleigenschaften homomerer HCN-Kanäle bisher nur für den HCN2-Kanal sauber bestimmt wurden (Thon et al., 2013). Um aber nach Koinjektion unterscheiden zu können, ob sich ein einzelner homomerer oder heteromerer Kanal im *Patch* befindet, müssen die Einzelkanaleigenschaften der entsprechenden homomeren HCN-Kanäle bekannt sein. Zusätzlich könnte keine Aussage zu den heteromeren Einzelkanaleigenschaften getroffen werden, wenn sie sich nicht von denen der homomeren Kanäle unterscheiden. Nach der Expression heteromerer Konkatomere wären in jedem *Patch* nur heteromere Kanäle zu finden.

Erweist sich die Konstruktion von funktionellen Konkatomeren als schwierig, könnte auf die Methode von Much und Mitarbeitern (2003) zurückgegriffen werden, nicht glykolysierbare HCN2-Untereinheiten mit HCN4-Untereinheiten zu koexprimieren (Much et al., 2003). Nicht glykolysierbare HCN2-Untereinheiten können allein nicht in eine Zellmembran eingebaut werden. Nur in Zusammenlagerung mit Wildtyp HCN4-Untereinheiten kann diese Untereinheit in die Zellmembran eingebaut werden. Bei der Koexpression beider Untereinheiten würden also nur heteromere HCN24-Kanäle und homomere HCN4-Kanäle entstehen. Bei einem RNA-Mischungsverhältnis mit überwiegend HCN2-RNA würden fast keine homomeren HCN4-Kanäle exprimiert (siehe Bild 5.1). Durch die in der vorliegenden Arbeit vermutete geringe Offenwahrscheinlichkeit (siehe Kapitel 4.1) und die beschränkte Anzahl an Kanälen in der Membran, hätten die HCN4-Kanäle so gut wie

keinen Einfluss auf die Eigenschaften des makroskopischen Stromes. Man könnte an solchen *Patches* die fast reinen elektrophysiologischen Eigenschaften von heteromeren HCN-Kanälen studieren.

Die bisherigen Untersuchungen zum Einfluss von cAMP auf das Schaltverhalten heteromerer HCN24-Kanäle erlauben nur indirekte Aussagen über ihr Bindungsverhalten. Mit Fluoreszenz-Messungen könnte dieses direkt untersucht werden. Dazu würde sich die konfokale *Patch-Clamp*-Fluorometrie anbieten, die eine parallele Messung von Kanalaktivierung und Ligandenbindung mit Hilfe von fluorophorgekoppelten Liganden erlaubt (Biskup et al., 2007; Kusch et al., 2010). Zu klären wäre allerdings ob und wie die bekannten fluoreszierenden Liganden an HCN4-Kanäle binden.

6 Schlussfolgerungen

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, zu einem besseren Verständnis der elektrophysiologischen Eigenschaften heteromerer HCN24-Kanäle beizutragen, wobei der Schwerpunkt auf der spannungsinduzierten Aktivierung liegt. Folgende Erkenntnisse konnten aus den durchgeführten *Patch-Clamp*-Experimenten gewonnen werden:

- 1) Die Koexpression von mHCN2- und mHCN4-Untereinheiten in Oozyten von *Xenopus laevis* führt zum Einbau funktioneller heteromerer HCN24-Kanäle in die Oozytenmembran.
- 2) Heteromere HCN24-Kanäle zeigen elektrophysiologische Eigenschaften, die sich von denen der homomeren HCN2- und HCN4-Kanäle unterscheiden.
 - 2.1) Heteromere HCN24-Kanäle öffnen in der *Cell-attached*-Konfiguration und in der *Inside-out*-Konfiguration ohne Ligand bei positiveren Spannungen als homomere HCN2- und HCN4-Kanäle.
 - 2.2) Heteromere HCN24-Kanäle sind stärker von intrazellulären Faktoren beeinflusst als HCN2- und HCN4-Kanäle.
 - 2.3) Heteromere HCN24-Kanäle sind durch ihre C-terminale Region schwächer auto-inhibiert als homomere HCN2- und HCN4-Kanäle.
 - 2.4) Die scheinbare Affinität heteromerer HCN24-Kanäle für cAMP liegt zwischen denen der homomeren HCN-Kanäle und dabei näher am HCN2-Kanal.
 - 2.5) Die Geschwindigkeit der spannungsinduzierten Aktivierung heteromerer HCN24-Kanäle ist durch die der schnelleren Isoform bestimmt.
- 3) Die elektrophysiologischen Eigenschaften der heteromeren HCN24-Kanäle können nicht durch eine Mischung der Eigenschaften homomerer HCN2- und HCN4-Kanäle erklärt werden.

Das mit dieser Arbeit gewonnene Wissen über die elektrophysiologischen Eigenschaften der heteromeren HCN24-Kanäle kann Grundlage für weiterführende Experimente mit heteromeren HCN24-Kanälen sein und zum Vergleich mit Schrittmacherströmen nativer Zellen herangezogen werden.

7 Literaturverzeichnis

- Akimoto, M, Zhang, Z, Boulton, S, Selvaratnam, R, VanSchouwen, B, Gloyd, M, Accili, EA, Lange, OF, Melacini, G. 2014. A mechanism for the auto-inhibition of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channel opening and its relief by cAMP. *J. Biol. Chem.* 289: 22205–22220.
- Altomare, C, Terragni, B, Brioschi, C, Milanesi, R, Pagliuca, C, Viscomi, C, Moroni, A, Baruscotti, M, DiFrancesco, D. 2003. Heteromeric HCN1-HCN4 channels: a comparison with native pacemaker channels from the rabbit sinoatrial node. *J. Physiol. (Lond.)* 549: 347–359.
- Beaumont, V, Zucker, RS. 2000. Enhancement of synaptic transmission by cyclic AMP modulation of presynaptic Ih channels. *Nat. Neurosci.* 3: 133–141.
- Bender, RA, Soleymani, SV, Brewster, AL, Nguyen, ST, Beck, H, Mathern, GW, Baram, TZ. 2003. Enhanced expression of a specific hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated cation channel (HCN) in surviving dentate gyrus granule cells of human and experimental epileptic hippocampus. *J. Neurosci.* 23: 6826–6836.
- Biel, M, Schneider, A, Wahl, C. 2002. Cardiac HCN channels: structure, function, and modulation. *Trends Cardiovasc. Med* 12: 206–212.
- Biel, M, Wahl-Schott, C, Michalakis, S, Zong, X. 2009. Hyperpolarization-activated cation channels: from genes to function. *Physiol. Rev* 89: 847–885.
- Biskup, C, Kusch, J, Schulz, E, Nache, V, Schwede, F, Lehmann, F, Hagen, V, Benndorf, K. 2007. Relating ligand binding to activation gating in CNGA2 channels. *Nature* 446: 440–443.
- Borlak, J, Thum, T. 2003. Hallmarks of ion channel gene expression in end-stage heart failure. *FASEB J.* 17: 1592–1608.
- Brewster, AL, Bernard, JA, Gall, CM, Baram, TZ. 2005. Formation of heteromeric hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated (HCN) channels in the hippocampus is regulated by developmental seizures. *Neurobiol. Dis.* 19: 200–207.

- Brown, HF, DiFrancesco, D, Noble, SJ. 1979. How does adrenaline accelerate the heart? *Nature* 280: 235–236.
- Brown, HF, Giles, W, Noble, SJ. 1977. Membrane currents underlying activity in frog sinus venosus. *J. Physiol. (Lond.)* 271: 783–816.
- Bruening-Wright, A, Elinder, F, Larsson, HP. 2007. Kinetic relationship between the voltage sensor and the activation gate in spHCN channels. *J. Gen. Physiol.* 130: 71–81.
- Cerbai, E, De Paoli, P, Sartiani, L, Lonardo, G, Mugelli, A. 2003. Treatment with irbesartan counteracts the functional remodeling of ventricular myocytes from hypertensive rats. *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 41: 804–812.
- Chandler, NJ, Greener, ID, Tellez, JO, Inada, S, Musa, H, Molenaar, P, DiFrancesco, D, Baruscotti, M, Longhi, R, Anderson, RH, Billeter, R, Sharma, V, Sigg, DC, Boyett, MR, Dobrzynski, H. 2009. Molecular architecture of the human sinus node: insights into the function of the cardiac pacemaker. *Circulation* 119: 1562–1575.
- Chen, J, Mitcheson, JS, Lin, M, Sanguinetti, MC. 2000. Functional roles of charged residues in the putative voltage sensor of the HCN2 pacemaker channel. *J. Biol. Chem.* 275: 36465–36471.
- Chen, K, Aradi, I, Thon, N, Eghbal-Ahmadi, M, Baram, TZ, Soltesz, I. 2001a. Persistently modified h-channels after complex febrile seizures convert the seizure-induced enhancement of inhibition to hyperexcitability. *Nat. Med.* 7: 331–337.
- Chen, S, Wang, J, Siegelbaum, SA. 2001b. Properties of hyperpolarization-activated pacemaker current defined by coassembly of HCN1 and HCN2 subunits and basal modulation by cyclic nucleotide. *J. Gen. Physiol.* 117: 491–504.
- Craven, KB, Olivier, NB, Zagotta, WN. 2008. C-terminal movement during gating in cyclic nucleotide-modulated channels. *J. Biol. Chem.* 283: 14728–14738.
- Craven, KB, Zagotta, WN. 2006. CNG and HCN channels: two peas, one pod. *Annu. Rev. Physiol.* 68: 375–401.
- DiFrancesco, D. 1981. A study of the ionic nature of the pace-maker current in calf Purkinje fibres. *J. Physiol. (Lond.)* 314: 377–393.

- DiFrancesco, D. 1993. Pacemaker mechanisms in cardiac tissue. *Annu. Rev. Physiol* 55: 455–472.
- DiFrancesco, D. 1991. The contribution of the “pacemaker” current (if) to generation of spontaneous activity in rabbit sino-atrial node myocytes. *J. Physiol. (Lond.)* 434: 23–40.
- DiFrancesco, D, Ferroni, A, Mazzanti, M, Tromba, C. 1986. Properties of the hyperpolarizing-activated current (if) in cells isolated from the rabbit sino-atrial node. *J. Physiol. (Lond.)* 377: 61–88.
- DiFrancesco, D, Tortora, P. 1991. Direct activation of cardiac pacemaker channels by intracellular cyclic AMP. *Nature* 351: 145–147.
- Dobrzynski, H, Nikolski, VP, Sambelashvili, AT, Greener, ID, Yamamoto, M, Boyett, MR, Efimov, IR. 2003. Site of origin and molecular substrate of atrioventricular junctional rhythm in the rabbit heart. *Circ. Res.* 93: 1102–1110.
- Doyle, DA, Morais Cabral, J, Pfuetzner, RA, Kuo, A, Gulbis, JM, Cohen, SL, Chait, BT, MacKinnon, R. 1998. The structure of the potassium channel: molecular basis of K⁺ conduction and selectivity. *Science* 280: 69–77.
- Dumont, JN. 1972. Oogenesis in *Xenopus laevis* (Daudin). I. Stages of oocyte development in laboratory maintained animals. *J. Morphol.* 136: 153–179.
- Edman, A, Gestrelus, S, Grampp, W. 1987. Current activation by membrane hyperpolarization in the slowly adapting lobster stretch receptor neurone. *J. Physiol. (Lond.)* 384: 671–690.
- Er, F, Larbig, R, Ludwig, A, Biel, M, Hofmann, F, Beuckelmann, DJ, Hoppe, UC. 2003. Dominant-negative suppression of HCN channels markedly reduces the native pacemaker current I(f) and undermines spontaneous beating of neonatal cardiomyocytes. *Circulation* 107: 485–489.
- Fain, GL, Quandt, FN, Bastian, BL, Gerschenfeld, HM. 1978. Contribution of a caesium-sensitive conductance increase to the rod photoresponse. *Nature* 272: 466–469.
- Fenske, S, Krause, S, Biel, M, Wahl-Schott, C. 2011. The role of HCN channels in ventricular repolarization. *Trends Cardiovasc. Med.* 21: 216–220.

- Fischer, T. 2012. Ligandenbindung und Schaltverhalten von heterotetrameren HCN2/HCN4-Schrittmacherkanälen [Diplomarbeit]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.
- Gauss, R, Seifert, R, Kaupp, UB. 1998. Molecular identification of a hyperpolarization-activated channel in sea urchin sperm. *Nature* 393: 583–587.
- Halliwel, JV, Adams, PR. 1982. Voltage-clamp analysis of muscarinic excitation in hippocampal neurons. *Brain Res.* 250: 71–92.
- Herrmann, S, Hofmann, F, Stieber, J, Ludwig, A. 2011a. HCN channels in the heart: Lessons from mouse mutants. *Br. J. Pharmacol.*
- Herrmann, S, Layh, B, Ludwig, A. 2011b. Novel insights into the distribution of cardiac HCN channels: an expression study in the mouse heart. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 51: 997–1006.
- Herrmann, S, Schnorr, S, Ludwig, A. 2015. HCN channels--modulators of cardiac and neuronal excitability. *Int J Mol Sci* 16: 1429–1447.
- Huang, C-C, Hsu, K-S. 2003. Reexamination of the role of hyperpolarization-activated cation channels in short- and long-term plasticity at hippocampal mossy fiber synapses. *Neuropharmacology* 44: 968–981.
- Ingram, SL, Williams, JT. 1996. Modulation of the hyperpolarization-activated current (I_h) by cyclic nucleotides in guinea-pig primary afferent neurons. *J. Physiol. (Lond.)* 492 (Pt 1): 97–106.
- Ishii, TM, Takano, M, Xie, LH, Noma, A, Ohmori, H. 1999. Molecular characterization of the hyperpolarization-activated cation channel in rabbit heart sinoatrial node. *J. Biol. Chem.* 274: 12835–12839.
- Jiang, Y-Q, Sun, Q, Tu, H-Y, Wan, Y. 2008. Characteristics of HCN channels and their participation in neuropathic pain. *Neurochem. Res.* 33: 1979–1989.
- Kaupp, UB, Seifert, R. 2001. Molecular diversity of pacemaker ion channels. *Annu. Rev. Physiol* 63: 235–257.

- Kusch, J, Biskup, C, Thon, S, Schulz, E, Nache, V, Zimmer, T, Schwede, F, Benndorf, K. 2010. Interdependence of receptor activation and ligand binding in HCN2 pacemaker channels. *Neuron* 67: 75–85.
- Kusch, J, Rose, J, Fischer, T, Thon, S, Benndorf, K. 2013. Voltage- and Camp-Dependent Gating in Heterotetrameric HCN2/4-Pacemaker Channels [Poster]. 92nd Annual Meeting of the German Physiological Society. Heidelberg.
- Laish-Farkash, A, Glikson, M, Brass, D, Marek-Yagel, D, Pras, E, Dascal, N, Antzelevitch, C, Nof, E, Reznik, H, Eldar, M, Luria, D. 2010. A novel mutation in the HCN4 gene causes symptomatic sinus bradycardia in Moroccan Jews. *J. Cardiovasc. Electrophysiol.* 21: 1365–1372.
- Liman, ER, Tytgat, J, Hess, P. 1992. Subunit stoichiometry of a mammalian K⁺ channel determined by construction of multimeric cDNAs. *Neuron* 9: 861–871.
- Lolicato, M, Nardini, M, Gazzarrini, S, Möller, S, Bertinetti, D, Herberg, FW, Bolognesi, M, Martin, H, Fasolini, M, Bertrand, JA, Arrigoni, C, Thiel, G, Moroni, A. 2011. Tetramerization dynamics of C-terminal domain underlies isoform-specific cAMP gating in hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem.* 286: 44811–44820.
- Ludwig, A, Zong, X, Jeglitsch, M, Hofmann, F, Biel, M. 1998. A family of hyperpolarization-activated mammalian cation channels. *Nature* 393: 587–591.
- Ludwig, A, Zong, X, Stieber, J, Hullin, R, Hofmann, F, Biel, M. 1999. Two pacemaker channels from human heart with profoundly different activation kinetics. *EMBO J* 18: 2323–2329.
- Luo, L, Chang, L, Brown, SM, Ao, H, Lee, DH, Higuera, ES, Dubin, AE, Chaplan, SR. 2007. Role of peripheral hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-modulated channel pacemaker channels in acute and chronic pain models in the rat. *Neuroscience* 144: 1477–1485.
- Lyashchenko, AK, Tibbs, GR. 2008. Ion binding in the open HCN pacemaker channel pore: fast mechanisms to shape “slow” channels. *J. Gen. Physiol.* 131: 227–243.

- Magee, JC. 2000. Dendritic integration of excitatory synaptic input. *Nat. Rev. Neurosci.* 1: 181–190.
- Maller, JL, Butcher, FR, Krebs, EG. 1979. Early effect of progesterone on levels of cyclic adenosine 3',5'-monophosphate in *Xenopus* oocytes. *J. Biol. Chem.* 254: 579–582.
- McCormick, DA, Pape, HC. 1990. Properties of a hyperpolarization-activated cation current and its role in rhythmic oscillation in thalamic relay neurones. *J. Physiol. (Lond.)* 431: 291–318.
- Milanesi, R, Baruscotti, M, Gneccchi-Ruscone, T, DiFrancesco, D. 2006. Familial sinus bradycardia associated with a mutation in the cardiac pacemaker channel. *N. Engl. J. Med* 354: 151–157.
- Moosmang, S, Stieber, J, Zong, X, Biel, M, Hofmann, F, Ludwig, A. 2001. Cellular expression and functional characterization of four hyperpolarization-activated pacemaker channels in cardiac and neuronal tissues. *Eur. J. Biochem* 268: 1646–1652.
- Much, B, Wahl-Schott, C, Zong, X, Schneider, A, Baumann, L, Moosmang, S, Ludwig, A, Biel, M. 2003. Role of subunit heteromerization and N-linked glycosylation in the formation of functional hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels. *J. Biol. Chem* 278: 43781–43786.
- Nof, E, Luria, D, Brass, D, Marek, D, Lahat, H, Reznik-Wolf, H, Pras, E, Dascal, N, Eldar, M, Glikson, M. 2007. Point mutation in the HCN4 cardiac ion channel pore affecting synthesis, trafficking, and functional expression is associated with familial asymptomatic sinus bradycardia. *Circulation* 116: 463–470.
- Noma, A, Irisawa, H. 1976. Membrane currents in the rabbit sinoatrial node cell as studied by the double microelectrode method. *Pflugers Arch.* 364: 45–52.
- Pape, HC. 1996. Queer current and pacemaker: the hyperpolarization-activated cation current in neurons. *Annu. Rev. Physiol* 58: 299–327.
- Pian, P, Bucci, A, Robinson, RB, Siegelbaum, SA. 2006. Regulation of gating and run-down of HCN hyperpolarization-activated channels by exogenous and endogenous PIP₂. *J. Gen. Physiol.* 128: 593–604.

-
- Proenza, C, Angoli, D, Agranovich, E, Macri, V, Accili, EA. 2002. Pacemaker channels produce an instantaneous current. *J. Biol. Chem.* 277: 5101–5109.
- Puljung, MC, DeBerg, HA, Zagotta, WN, Stoll, S. 2014. Double electron-electron resonance reveals cAMP-induced conformational change in HCN channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 111: 9816–9821.
- Qu, J, Altomare, C, Bucci, A, DiFrancesco, D, Robinson, RB. 2002. Functional comparison of HCN isoforms expressed in ventricular and HEK 293 cells. *Pflügers Arch.* 444: 597–601.
- Santoro, B, Grant, SG, Bartsch, D, Kandel, ER. 1997. Interactive cloning with the SH3 domain of N-src identifies a new brain specific ion channel protein, with homology to eag and cyclic nucleotide-gated channels. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 94: 14815–14820.
- Santoro, B, Liu, DT, Yao, H, Bartsch, D, Kandel, ER, Siegelbaum, SA, Tibbs, GR. 1998. Identification of a gene encoding a hyperpolarization-activated pacemaker channel of brain. *Cell* 93: 717–729.
- Schulze-Bahr, E, Neu, A, Friederich, P, Kaupp, UB, Breithardt, G, Pongs, O, Isbrandt, D. 2003. Pacemaker channel dysfunction in a patient with sinus node disease. *J. Clin. Invest* 111: 1537–1545.
- Schünke, S, Stoldt, M. 2013. Structural snapshot of cyclic nucleotide binding domains from cyclic nucleotide-sensitive ion channels. *Biol. Chem.* 394: 1439–1451.
- Schweizer, PA, Duhme, N, Thomas, D, Becker, R, Zehelein, J, Draguhn, A, Bruehl, C, Katus, HA, Koenen, M. 2010. cAMP sensitivity of HCN pacemaker channels determines basal heart rate but is not critical for autonomic rate control. *Circ Arrhythm Electrophysiol* 3: 542–552.
- Schweizer, PA, Schröter, J, Greiner, S, Haas, J, Yampolsky, P, Mereles, D, Buss, SJ, Seyler, C, Bruehl, C, Draguhn, A, Koenen, M, Meder, B, Katus, HA, Thomas, D. 2014. The symptom complex of familial sinus node dysfunction and myocardial noncompaction is associated with mutations in the HCN4 channel. *J. Am. Coll. Cardiol.* 64: 757–767.

- Seifert, R, Scholten, A, Gauss, R, Mincheva, A, Lichter, P, Kaupp, UB. 1999. Molecular characterization of a slowly gating human hyperpolarization-activated channel predominantly expressed in thalamus, heart, and testis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 96: 9391–9396.
- Shi, W, Wymore, R, Yu, H, Wu, J, Wymore, RT, Pan, Z, Robinson, RB, Dixon, JE, McKinnon, D, Cohen, IS. 1999. Distribution and prevalence of hyperpolarization-activated cation channel (HCN) mRNA expression in cardiac tissues. *Circ. Res* 85: e1–6.
- St Clair, JR, Liao, Z, Larson, ED, Proenza, C. 2013. PKA-independent activation of I(f) by cAMP in mouse sinoatrial myocytes. *Channels (Austin)* 7: 318–321.
- Stieber, J, Herrmann, S, Feil, S, Löster, J, Feil, R, Biel, M, Hofmann, F, Ludwig, A. 2003a. The hyperpolarization-activated channel HCN4 is required for the generation of pacemaker action potentials in the embryonic heart. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100: 15235–15240.
- Stieber, J, Stöckl, G, Herrmann, S, Hassfurth, B, Hofmann, F. 2005. Functional expression of the human HCN3 channel. *J. Biol. Chem* 280: 34635–34643.
- Stieber, J, Thomer, A, Much, B, Schneider, A, Biel, M, Hofmann, F. 2003b. Molecular basis for the different activation kinetics of the pacemaker channels HCN2 and HCN4. *J. Biol. Chem* 278: 33672–33680.
- Taraska, JW, Puljung, MC, Olivier, NB, Flynn, GE, Zagotta, WN. 2009. Mapping the structure and conformational movements of proteins with transition metal ion FRET. *Nat. Methods* 6: 532–537.
- Thollon, C, Bedut, S, Villeneuve, N, Cogé, F, Piffard, L, Guillaumin, J-P, Brunel-Jacquemin, C, Chomarat, P, Boutin, J-A, Peglion, J-L, Vilaine, J-P. 2007. Use-dependent inhibition of hHCN4 by ivabradine and relationship with reduction in pacemaker activity. *Br. J. Pharmacol.* 150: 37–46.
- Thon, S. 2012. Die Wechselbeziehung zwischen Aktivierung und Ligandenbindung in HCN2-Schrittmacherkanälen [Dissertation]. Jena: Friedrich-Schiller-Universität.

-
- Thon, S, Schmauder, R, Benndorf, K. 2013. Elementary functional properties of single HCN2 channels. *Biophys. J.* 105: 1581–1589.
- Ueda, K, Nakamura, K, Hayashi, T, Inagaki, N, Takahashi, M, Arimura, T, Morita, H, Higashiuesato, Y, Hirano, Y, Yasunami, M, Takishita, S, Yamashina, A, Ohe, T, Sunamori, M, Hiraoka, M, Kimura, A. 2004. Functional characterization of a trafficking-defective HCN4 mutation, D553N, associated with cardiac arrhythmia. *J. Biol. Chem* 279: 27194–27198.
- Ulen, C, Siegelbaum, SA. 2003. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channels by cAMP through a gating switch in binding domain symmetry. *Neuron* 40: 959–970.
- Ulen, C, Tytgat, J. 2001. Functional heteromerization of HCN1 and HCN2 pacemaker channels. *J. Biol. Chem* 276: 6069–6072.
- Wainger, BJ, DeGennaro, M, Santoro, B, Siegelbaum, SA, Tibbs, GR. 2001. Molecular mechanism of cAMP modulation of HCN pacemaker channels. *Nature* 411: 805–810.
- Wang, J, Chen, S, Siegelbaum, SA. 2001. Regulation of hyperpolarization-activated HCN channel gating and cAMP modulation due to interactions of COOH terminus and core transmembrane regions. *J. Gen. Physiol* 118: 237–250.
- Whitaker, GM, Angoli, D, Nazzari, H, Shigemoto, R, Accili, EA. 2007. HCN2 and HCN4 isoforms self-assemble and co-assemble with equal preference to form functional pacemaker channels. *J. Biol. Chem* 282: 22900–22909.
- Wollmuth, LP, Hille, B. 1992. Ionic selectivity of Ih channels of rod photoreceptors in tiger salamanders. *J. Gen. Physiol.* 100: 749–765.
- Xue, T, Marbán, E, Li, RA. 2002. Dominant-negative suppression of HCN1- and HCN2-encoded pacemaker currents by an engineered HCN1 construct: insights into structure-function relationships and multimerization. *Circ. Res.* 90: 1267–1273.
- Yellen, G. 2002. The voltage-gated potassium channels and their relatives. *Nature* 419: 35–42.

- Yu, FH, Yarov-Yarovoy, V, Gutman, GA, Catterall, WA. 2005. Overview of molecular relationships in the voltage-gated ion channel superfamily. *Pharmacol. Rev.* 57: 387–395.
- Zagotta, WN, Olivier, NB, Black, KD, Young, EC, Olson, R, Gouaux, E. 2003. Structural basis for modulation and agonist specificity of HCN pacemaker channels. *Nature* 425: 200–205.
- Zhang, Q, Huang, A, Lin, Y-C, Yu, H-G. 2009. Associated changes in HCN2 and HCN4 transcripts and I(f) pacemaker current in myocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 1788: 1138–1147.
- Zheng, J, Zagotta, WN. 2004. Stoichiometry and assembly of olfactory cyclic nucleotide-gated channels. *Neuron* 42: 411–421.
- Zolles, G, Klöcker, N, Wenzel, D, Weisser-Thomas, J, Fleischmann, BK, Roeper, J, Fakler, B. 2006. Pacemaking by HCN channels requires interaction with phosphoinositides. *Neuron* 52: 1027–1036.
- Zong, X, Eckert, C, Yuan, H, Wahl-Schott, C, Abicht, H, Fang, L, Li, R, Mistrik, P, Gerstner, A, Much, B, Baumann, L, Michalakakis, S, Zeng, R, Chen, Z, Biel, M. 2005. A novel mechanism of modulation of hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels by Src kinase. *J. Biol. Chem.* 280: 34224–34232.

8 Anhang

8.1 Zusatzmaterial

Tab. 8.1: $V_{0,5}$ (mV) aller Kanäle in der *Cell-attached*-Konfiguration (ca) und in der *Inside-out*-Konfiguration bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen (μM) ($n = 7 - 16$)

	ca	0	0,01	0,03	0,1	0,3	1	10
HCN2	-104 ± 1	-124 ± 1	-120 ± 1	-118 ± 1	-113 ± 1	-107 ± 1	-105 ± 1	-104 ± 1
HCN24 10:1	-99 ± 2	-123 ± 1	-121 ± 2	-117 ± 1	-116 ± 2	-107 ± 1	-107 ± 2	-102 ± 2
HCN24 1:1	-100 ± 1	-120 ± 2	-117 ± 1	-118 ± 2	-116 ± 2	-110 ± 1	-107 ± 1	-105 ± 1
HCN24 1:10	-96 ± 1	-118 ± 1	-117 ± 1	-117 ± 1	-115 ± 1	-112 ± 1	-108 ± 1	-106 ± 1
HCN4	-106 ± 2	-122 ± 2	-119 ± 2	-119 ± 1	-118 ± 2	-117 ± 1	-115 ± 1	-106 ± 2

Tab. 8.2: $z\delta$ aller Kanäle in der *Cell-attached*-Konfiguration (ca) und in der *Inside-out*-Konfiguration bei verschiedenen cAMP-Konzentrationen (μM) ($n = 7 - 16$)

	ca	0	0,01	0,03	0,1	0,3	1	10
HCN2	$4,9 \pm 0,4$	$5,9 \pm 0,4$	$5,5 \pm 0,3$	$5,1 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,3$	$5,6 \pm 0,3$	$6,2 \pm 0,2$
HCN24 10:1	$4,6 \pm 0,2$	$5,7 \pm 0,4$	$5,3 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,3$	$5,9 \pm 0,3$	$5,5 \pm 0,5$
HCN24 1:1	$4,6 \pm 0,2$	$5,5 \pm 0,2$	$5,3 \pm 0,1$	$4,4 \pm 0,2$	$4,6 \pm 0,2$	$4,9 \pm 0,2$	$5,2 \pm 0,4$	$5,4 \pm 0,3$
HCN24 1:10	$4,2 \pm 0,3$	$4,8 \pm 0,1$	$4,3 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,1$	$4,0 \pm 0,1$	$3,9 \pm 0,1$	$4,2 \pm 0,2$	$4,5 \pm 0,2$
HCN4	$3,7 \pm 0,2$	$4,8 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,3$	$4,3 \pm 0,2$	$3,8 \pm 0,1$	$4,1 \pm 0,2$	$4,7 \pm 0,4$

Tab. 8.3: EC_{50} (μM) aller Kanäle für unterschiedliche Spannungen (mV) ($n = 7 - 15$)

	-90	-100	-110	-120	-130	-140
HCN2	$0,2 \pm 0,02$	$0,16 \pm 0,01$	$0,13 \pm 0,02$	$0,08 \pm 0,05$	$0,06 \pm 0,02$	
HCN24 1:10		1 ± 1	$0,15 \pm 0,06$	$0,06 \pm 0,06$	$0,05 \pm 0,01$	$0 \pm 0,2$
HCN24 1:1	$0,9 \pm 0,4$	$0,5 \pm 0,1$	$0,25 \pm 0,05$	$0,2 \pm 0,1$	$0,03 \pm 0,03$	
HCN24 1:10	2 ± 1	$1,2 \pm 0,7$	$0,36 \pm 0,05$	$0,19 \pm 0,04$	$0,08 \pm 0,04$	$0,03 \pm 0,05$

Tab. 8.4: τ (s) in der *Cell-attached*-Konfiguration bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 3 - 15)

	-90	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160
HCN2		4,1 ± 0,8	1,9 ± 0,2	0,7 ± 0,1	0,37 ± 0,06	0,24 ± 0,05		0,2 ± 0,04
HCN24 10:1	4,9 ± 0,7	2,2 ± 0,4	0,7 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,34 ± 0,03	0,21 ± 0,01	0,18 ± 0,02	
HCN24 1:1	6,1 ± 0,5	2,7 ± 0,3	1,2 ± 0,1	0,6 ± 0,06	0,34 ± 0,03	0,23 ± 0,02	0,2 ± 0,02	
HCN24 1:10		3,2 ± 0,6	1,4 ± 0,2	0,72 ± 0,07	0,4 ± 0,03	0,27 ± 0,03		
HCN4			4,6 ± 0,6	3 ± 0,5	1,6 ± 0,2	0,9 ± 0,1	0,6 (n = 2)	

Tab. 8.5: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration ohne cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 7 - 14)

	-110	-120	-130	-140	-150	-160
HCN2		2,9 ± 0,5	1,4 ± 0,1	0,8 ± 0,1	0,7 ± 0,1	0,5 ± 0,1
HCN24 10:1		2,9 ± 0,3	0,79 ± 0,07	0,79 ± 0,07	0,6 ± 0,04	0,49 ± 0,04
HCN24 1:1	4,3 ± 0,5	2,2 ± 0,3	1,3 ± 0,2	0,69 ± 0,08	0,5 ± 0,06	0,35 ± 0,04
HCN24 1:10		3 ± 0,5	1,4 ± 0,2	0,77 ± 0,05	0,47 ± 0,02	0,37 ± 0,03
HCN4		4,5 ± 0,7	3 ± 0,5	1,8 ± 0,3	0,9 ± 0,1	0,54 ± 0,04

Tab. 8.6: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 0,01 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 5 - 11)

	-110	-120	-130	-140	-150	-160
HCN2	5 ± 1	2,2 ± 0,1	1,05 ± 0,08	0,66 ± 0,05	0,5 ± 0,03	0,46 ± 0,08
HCN24 10:1	5 ± 0,6	3,9 ± 0,5	0,9 ± 0,1	0,9 ± 0,1	0,63 ± 0,07	0,54 ± 0,05
HCN24 1:1	6 ± 1	2,2 ± 0,3	0,98 ± 0,08	0,57 ± 0,02	0,38 ± 0,008	0,27 ± 0,01
HCN24 1:10		3,8 ± 0,9	1,49 ± 0,09	0,86 ± 0,06	0,54 ± 0,04	0,4 ± 0,03
HCN4		4,3 ± 0,6	3,5 ± 0,7	1,4 ± 0,2	0,63 ± 0,06	

Tab. 8.7: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 0,03 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 5 - 10)

	-110	-120	-130	-140	-150	-160
HCN2	$3,6 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,2$	$0,95 \pm 0,06$	$0,59 \pm 0,04$	$0,45 \pm 0,04$	
HCN24 10:1	$4,9 \pm 0,7$	$2,7 \pm 0,4$	$0,78 \pm 0,09$	$0,78 \pm 0,09$	$0,58 \pm 0,08$	
HCN24 1:1	5 ± 1	$2,3 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,2$	$0,7 \pm 0,09$	$0,48 \pm 0,06$	$0,4 \pm 0,05$
HCN24 1:10	$4,7 \pm 0,7$	$2,9 \pm 0,5$	$1,5 \pm 0,2$	$0,81 \pm 0,06$	$0,5 \pm 0,04$	
HCN4		$5,3 \pm 0,6$	$3,1 \pm 0,4$	$1,3 \pm 0,2$	$0,6 \pm 0,05$	

Tab. 8.8: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 0,1 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 6 - 15)

	-100	-110	-120	-130	-140	-150	-160
HCN2	6 ± 1	$2,9 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$0,73 \pm 0,09$	$0,46 \pm 0,05$	$0,33 \pm 0,02$	
HCN24 10:1	6 ± 1	$4 \pm 0,8$	$0,86 \pm 0,08$	$0,86 \pm 0,08$	$0,55 \pm 0,05$	$0,4 \pm 0,03$	
HCN24 1:1		$3,9 \pm 0,6$	$2,1 \pm 0,5$	$0,9 \pm 0,1$	$0,54 \pm 0,07$	$0,39 \pm 0,04$	$0,4$ (n = 2)
HCN24 1:10		5 ± 1	$2,4 \pm 0,3$	$1,2 \pm 0,1$	$0,73 \pm 0,07$	$0,43 \pm 0,04$	
HCN4			$4,5 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,4$	$1,5 \pm 0,2$	$0,76 \pm 0,07$	

Tab. 8.9: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 0,3 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 8 - 13)

	-100	-110	-120	-130	-140	-150
HCN2	$4,6 \pm 0,9$	$2,3 \pm 0,4$	$0,9 \pm 0,1$	$0,48 \pm 0,04$	$0,34 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,03$
HCN24 10:1	$4,8 \pm 0,6$	$2 \pm 0,3$	$0,52 \pm 0,04$	$0,52 \pm 0,04$	$0,38 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$
HCN24 1:1		$2,7 \pm 0,2$	$1,2 \pm 0,1$	$0,57 \pm 0,06$	$0,37 \pm 0,04$	$0,26 \pm 0,03$
HCN24 1:10		$3,7 \pm 0,8$	$2 \pm 0,3$	$0,98 \pm 0,07$	$0,59 \pm 0,04$	$0,36 \pm 0,03$
HCN4			$4,9 \pm 0,4$	$2,3 \pm 0,1$	$1,1 \pm 0,1$	$0,59 \pm 0,06$

Tab. 8.10: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 1 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 3 - 13)

	-100	-110	-120	-130	-140	-150
HCN2	$4,3 \pm 0,9$	$1,6 \pm 0,2$	$0,65 \pm 0,06$	$0,39 \pm 0,03$	$0,28 \pm 0,02$	$0,26 \pm 0,08$
HCN24 10:1	6 ± 1	$2 \pm 0,3$	$0,4 \pm 0,03$	$0,4 \pm 0,03$	$0,29 \pm 0,02$	
HCN24 1:1	$5,8 \pm 0,7$	$2 \pm 0,2$	$0,77 \pm 0,07$	$0,38 \pm 0,04$	$0,25 \pm 0,03$	$0,21 \pm 0,02$
HCN24 1:10	$4,9 \pm 0,9$	$3,1 \pm 0,4$	$1,4 \pm 0,2$	$0,8 \pm 0,07$	$0,48 \pm 0,04$	
HCN4		10 ± 1	$4,5 \pm 0,3$	$2,1 \pm 0,2$	$1,1 \pm 0,08$	$0,49 \pm 0,03$

Tab. 8.11: τ (s) in der *Inside-out*-Konfiguration mit 10 μ M cAMP bei verschiedenen Spannungen (mV) (n = 7 - 16)

	-100	-110	-120	-130	-140	-150
HCN2	$5,1 \pm 0,8$	$1,6 \pm 0,2$	$0,57 \pm 0,07$	$0,29 \pm 0,02$	$0,23 \pm 0,03$	$0,28$ (n = 2)
HCN24 10:1	$3,7 \pm 0,6$	$1,4 \pm 0,2$	$0,35 \pm 0,04$	$0,35 \pm 0,04$	$0,23 \pm 0,02$	
HCN24 1:1	$4,2 \pm 0,7$	$1,8 \pm 0,4$	$0,7 \pm 0,1$	$0,33 \pm 0,04$	$0,22 \pm 0,02$	$0,16$ (n = 2)
HCN24 1:10	$3,7 \pm 0,3$	$2,3 \pm 0,4$	$1 \pm 0,1$	$0,53 \pm 0,07$	$0,31 \pm 0,04$	$0,17 \pm 0,02$
HCN4		5 ± 1	$2,3 \pm 0,4$	$1,1 \pm 0,2$	$0,62 \pm 0,09$	$0,41 \pm 0,09$

8.2 Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials, den molekularbiologischen Arbeiten sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Dr. Jana Kusch, Dr. Susanne Thon, Dr. Ralf Schmauder, Prof. Thomas Zimmer, Dr. Gunter Ehrlich und Karin Schoknecht,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Ort, Datum

Unterschrift des Verfassers

8.3 Danksagung

Ich freue mich, an dieser Stelle allen herzlich danken zu können, die zum Gelingen der vorliegenden Arbeit beigetragen haben:

Prof. Dr. Klaus Benndorf für die Möglichkeit dieses interessante Thema zu bearbeiten, seine Offenheit für die flexible Gestaltung meiner Arbeit und die fruchtbaren Diskussionen an Schreibtisch und Messstand

Allen Mitarbeitern des Instituts für Herz-Kreislauf-Physiologie für die herzliche Aufnahme und tatkräftige Unterstützung

Dr. Jana Kusch für die geduldige Vermittlung der *Patch-Clamp*-Technik, ihre Motivationskünste, ihre Unterstützung meines Stipendiantrages, das großzügige Streichen ganzer Abschnitte und die stete Formung meiner Vorstellung vom richtigen Umfang sowie ihre intensive Betreuung und ein offenes Ohr für Fragen aller Art

Dr. Susanne Thon für ihre Erdung und den ständigen Realitätsabgleich, den Erfahrungsaustausch über den HCN-Kanal und die *Patch-Clamp*-Technik sowie die immer sehr erhellenden Diskussionen über meine Ergebnisse

Dr. Ralf Schmauder, Sabine Hummert und Dr. Thomas Eick für die Veranschaulichung mathematischer Zusammenhänge mit ausgefeilten Skizzen

Karin Schoknecht, Dr. Gunter Ehrlich und Prof. Dr. Thomas Zimmer für die Durchführung der molekularbiologischen Arbeiten

Karin Schoknecht, Sandra Bernhardt und Andrea Kolchmeier für ihre hervorragende technische Assistenz

Dem Interdisziplinären Zentrum für Klinische Forschung für die Förderung durch ein Promotionsstipendium

Meinem Mann für die moralische Unterstützung, die Hilfe am PC und den Verzicht auf eine ausgeglichene Ehefrau während der Schreibphase